

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 650**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/US2015/020603**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138997**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15761889 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3117012**

54 Título: **Métodos de monitorización de terapias inmunosupresoras en un receptor de trasplante**

30 Prioridad:

14.03.2014 US 201461953582 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.10.2019

73 Titular/es:

**CAREDX, INC. (100.0%)
3260 Bayshore Boulevard
Brisbane CA 94005, US**

72 Inventor/es:

**WOODWARD, ROBERT;
GRSKOVIC, MARICA;
YEE, JIM;
NELLES, MITCH y
HILLER, DAVID**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 726 650 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de monitorización de terapias inmunosupresoras en un receptor de trasplante

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a métodos de monitorización del estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante, así como a métodos de monitorización y ajuste de terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante.

10

Antecedentes

El sistema inmunitario desempeña un papel defensivo en sujetos, tales como un individuo humano, pero también puede provocar enfermedades, trastornos y otros estados no deseados. En el caso de un trasplante previsto médicamente de células, tejidos u órganos no propios (aloinjerto) a un individuo, el sistema inmunitario del receptor reconoce que el aloinjerto es extraño para el cuerpo y activa diversos mecanismos para rechazar el aloinjerto. Por tanto, es necesario suprimir médicamente las respuestas normales del sistema inmunitario para rechazar el trasplante. La práctica médica de la inmunosupresión en receptores de trasplantes ha evolucionado para incluir un régimen de agentes profilácticos farmacológicos, que comienza normalmente con terapias de inducción para agotar los linfocitos, seguido por fármacos de mantenimiento destinados a inhibir la activación o replicación de linfocitos tales como corticosteroides, inhibidores de calcineurina (tales como tacrolimús) e inhibidores adicionales de la replicación de linfocitos (tales como micofenolato mofetilo). El cambio o la variación de la cantidad de fármacos inmunosupresores administrada a un receptor de trasplante ha estado guiada en gran medida por la experiencia empírica. Tras el trasplante, la dosificación de inmunosupresor(es) se reduce a lo largo del tiempo para reducir la incidencia y gravedad de efectos secundarios, tales como aumento del riesgo de enfermedades infecciosas, al tiempo que se evita todavía el rechazo inmunitario del aloinjerto.

Después del trasplante, el estado del aloinjerto en el receptor del trasplante puede monitorizarse durante el resto de su vida, incluyendo la función de evaluación del aloinjerto y el rechazo del aloinjerto mediado por el sistema inmunitario. En trasplante de corazón, por ejemplo, la vigilancia del rechazo puede incluir hasta 15 biopsias programadas en el plazo del primer año del trasplante para proporcionar muestras del músculo cardíaco para su evaluación histológica por un patólogo. Cada procedimiento de biopsia es invasivo (paso percutáneo de un catéter transvenoso al interior del ventrículo derecho del corazón), estresante, incómodo y conlleva riesgos de procedimiento para el paciente, además de ser costoso. Además, la toma de muestras de biopsias es extremadamente localizada, de modo que no se detectan anomalías histológicas en ninguna zona del corazón en la que no se haya realizado una biopsia. La clasificación de las biopsias es subjetiva y entre patólogos independientes es común la discordancia de los hallazgos en la biopsia. En la atención clínica convencional de los receptores de trasplantes, hay una variedad de pruebas de diagnóstico de laboratorio clínico, además de biopsias periódicas, que proporcionan algo de información relacionada con el estado del aloinjerto. Por ejemplo, se miden los niveles valle en suero del fármaco inhibidor de la calcineurina para estimar la adecuación de la cobertura prevista. Otros ensayos detectan la presencia de anticuerpos dirigidos contra el aloinjerto. La biopsia se usa principalmente para la vigilancia del rechazo del trasplante en el plazo del primer año, pero este método invasivo no es muy adecuado ni está establecido para guiar la terapia inmunosupresora individualizada en la atención de mantenimiento a largo plazo (por ejemplo, más allá de un año después del trasplante) de los pacientes. Los métodos de expresión génica no invasivos informan sobre el estado del sistema inmunitario mediante el examen del estado de los genes expresados en células inmunitarias. La prueba de expresión molecular AlloMap es una prueba aprobada por la FDA disponible para los receptores de trasplantes de corazón. Están en desarrollo pruebas para monitorizar otros trasplantes de órganos sólidos.

Además de los métodos de biopsia invasiva existentes para monitorizar el estado del trasplante, actualmente no hay pruebas específicas con una capacidad demostrada para guiar la individualización (y minimización adicional) de los fármacos inmunosupresores para el mantenimiento a largo plazo de un receptor de trasplante. Los datos, en su mayoría derivados de estudios de registro, han identificado determinados factores de riesgo clínico para la muerte o pérdida del trasplante, tales como la edad, el sexo y la raza del receptor, así como características del donante, tales como la isquemia fría, el tiempo y la edad. Sin embargo, la determinación de estos factores de riesgo clínico no suplanta la necesidad de tratamiento individualizado y vigilancia de rutina de los receptores de trasplantes.

Existe la necesidad de métodos no invasivos mejorados de diagnóstico y monitorización de ese estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante, así como métodos de determinación de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra a un receptor de trasplante.

En *Clinical Chemistry*, 59:12, págs. 1732-1741 (2013) se da a conocer el uso de PCR de gota digital para la cuantificación rápida del ADN del donante en la circulación del receptor de trasplante como potencial biomarcador universal de lesión del injerto.

En el documento WO2014/194113 se dan a conocer métodos, composiciones y kits relacionados con la detección de ADN libre de células del donante en la circulación de un receptor de trasplante de órgano para la identificación

temprana del rechazo de trasplante.

Breve resumen

5 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos de monitorización de la terapia inmunosupresora en un sujeto, incluyendo el método: a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante, b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en donde el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor, c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante y d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en donde un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado y una base para ajustar la terapia inmunosupresora.

15 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos de ajuste de una terapia inmunosupresora en un sujeto, incluyendo el método: a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante, b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en donde el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor, c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante, d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en donde un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado, e) ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto.

En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de rechazo de trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, una disminución en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de tolerancia al trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, ningún cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de estado de rechazo de trasplante estable y/u oportunidad de ajuste de la terapia inmunosupresora. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se aumenta. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se disminuye. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se mantiene. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el trasplante de órgano es un trasplante de riñón. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el trasplante de órgano es un trasplante de corazón. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la muestra es una muestra de plasma. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores o aspectos, el panel de SNP incluye al menos 20 SNP independientes. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el panel de SNP incluye SNP independientes seleccionados de rs1004357, rs10092491, rs1019029, rs1027895, rs10488710, rs10500617, rs1058083, rs10768550, rs10773760, rs10776839, rs1109037, rs12480506, rs1294331, rs12997453, rs13134862, rs13182883, rs13218440, rs1336071, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1490413, rs1498553, rs1523537, rs1554472, rs159606, rs1736442, rs1821380, rs1872575, rs2046361, rs2073383, rs214955, rs2175957, rs221956, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2342747, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs279844, rs2811231, rs2833736, rs2920816, rs315791, rs321198, rs338882, rs3744163, rs3780962, rs4288409, rs430046, rs4364205, rs445251, rs4530059, rs4606077, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs560681, rs5746846, rs576261, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs6811238, rs689512, rs6955448, rs7041158, rs7205345, rs722290, rs7229946, rs740598, rs7520386, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs9905977, rs993934 y rs9951171. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuenciación del panel de SNP se realiza usando una plataforma de secuenciación múltiple. En algunos aspectos que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones o aspectos anteriores, el intervalo de tiempo es de aproximadamente 12-14 meses tras producirse el trasplante del sujeto donante al receptor. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el método incluye además someter a prueba la carga viral. En algunas realizaciones, la prueba incluye determinar la presencia de un virus seleccionado de CMV, VEB, anellovirus y VBK. En algunos aspectos que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones o aspectos anteriores, el método incluye además realizar uno o más ensayos de obtención del perfil de expresión génica. En algunas realizaciones, el ensayo de obtención del perfil de expresión génica es una prueba AlloMap.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos de monitorización del estado de un órgano trasplantado en un sujeto, incluyendo el método: a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante, b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en donde el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor, c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante y d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en donde un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos de monitorización de la terapia inmunosupresora en un sujeto, incluyendo el método: a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante, b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en donde el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor, c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante y d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en donde un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado y una base para ajustar la terapia inmunosupresora.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos de ajuste de una terapia inmunosupresora en un sujeto, incluyendo el método: a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante, b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en donde el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor, c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante, d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en donde un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado, y e) ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto.

En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de rechazo de trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, una disminución en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de tolerancia al trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, ningún cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de estado de rechazo de trasplante estable y/o oportunidad de ajuste de la terapia inmunosupresora. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se aumenta. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se disminuye. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se mantiene. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el trasplante de órgano es un trasplante de riñón. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el trasplante de órgano es un trasplante de corazón. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el trasplante de órgano se selecciona de un trasplante de hígado, un trasplante de pulmón y un trasplante de páncreas. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la muestra es una muestra de plasma. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el panel de SNP incluye SNP independientes seleccionados de rs1004357, rs10092491, rs1019029, rs1027895, rs10488710, rs10500617, rs1058083, rs10768550, rs10773760, rs10776839, rs1109037, rs12480506, rs1294331, rs12997453, rs13134862, rs13182883, rs13218440, rs1336071, rs1358856, rs1004357, rs10092491, rs1019029, rs1027895, rs10488710, rs10500617, rs1058083, rs10768550, rs10773760, rs10776839, rs1109037, rs12480506, rs1294331, rs12997453, rs13134862, rs13182883, rs13218440, rs1336071, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1490413, rs1498553, rs1523537, rs1554472, rs159606, rs1736442, rs1821380, rs1872575, rs2046361, rs2073383, rs214955, rs2175957, rs221956, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2342747, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs279844, rs2811231, rs2833736, rs2920816, rs315791, rs321198, rs338882, rs3744163, rs3780962, rs4288409, rs430046, rs4364205, rs445251, rs4530059, rs4606077, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs560681, rs5746846, rs576261, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs6811238, rs689512, rs6955448, rs7041158, rs7205345, rs722290, rs7229946, rs740598, rs7520386, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs9905977, rs993934 y rs9951171. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el panel de SNP incluye SNP que tienen una frecuencia de alelo minoritario en la población

global de >0,4, una frecuencia de alelo minoritario en la población diana de >0,4, la tasa de error de polimerasa más baja de las 6 posibles transiciones o transversiones de alelos y la distancia genómica entre cada SNP independiente es >500kb. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el panel de SNP incluye SNP independientes seleccionados de rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. En algunas realizaciones, el panel de SNP incluye de aproximadamente 195 a aproximadamente 200, de aproximadamente 200 a aproximadamente 205, de aproximadamente 210 a aproximadamente 215, de aproximadamente 215 a aproximadamente 220, de aproximadamente 220 a aproximadamente 225, de aproximadamente 225 a aproximadamente 230, de aproximadamente 230 a aproximadamente 235, de aproximadamente 235 a aproximadamente 240, de aproximadamente 240 a aproximadamente 245, de aproximadamente 245 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 255, de aproximadamente 255 a aproximadamente 260, de aproximadamente 260 a aproximadamente 265 o de aproximadamente 260 a aproximadamente 266 de los SNP independientes. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el panel de SNP incluye rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. En

algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, la secuenciación del panel de SNP se realiza usando una plataforma de secuenciación múltiplex. Según la invención, el nivel de ADN libre de células derivado del donante en la muestra se determina sin usar información del genotipo. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el método incluye además someter a prueba la presencia de un agente infeccioso. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente infeccioso se selecciona de virus, bacterias, hongos y parásitos. En algunas realizaciones, los virus se seleccionan de citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, Anelloviridae y virus BK. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones o aspectos anteriores, el método incluye además realizar uno o más ensayos de obtención del perfil de expresión génica. En algunas realizaciones, se calcula una puntuación de combinación basándose en los resultados del nivel de ADN libre de células derivado del donante y los resultados del ensayo de obtención del perfil de expresión génica. En algunas realizaciones que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el ensayo de obtención del perfil de expresión génica es una prueba AlloMap.

15 Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra que el ADN libre de células derivado del donante (ADNlc-dd) es mayor en el plasma tomado de receptores de trasplantes de corazón que experimentan rechazo celular agudo que de aquellos que no experimentan rechazo. Los datos se generaron usando plasma de receptores de trasplante de corazón recogidos en tubos de PPT. Las muestras de pacientes se asignaron a las categorías NR (no rechazo) y R (rechazo) basándose en el estado de la biopsia endomiocárdica realizada en la misma visita del paciente. El ADN libre de células derivado del donante se expresa como porcentaje del ADN libre de células total, medido tal como se describe en el presente documento. Los grupos difieren mediante la prueba de la t ($P=0,017$).

La figura 2 ilustra que el ADNlc-dd está elevado antes del rechazo del trasplante de corazón. Los datos se generaron usando plasma de receptores de trasplante de corazón recogidos en tubos de PPT. A las muestras de pacientes se les asignó el estado R (rechazo) basándose en estado de la biopsia endomiocárdica realizada en la misma visita del paciente. Las visitas previas al evento de rechazo se agruparon según el tiempo anterior a la visita de rechazo (25 o menos días o más de 25 días). El ADN libre de células derivado del donante se expresa como porcentaje del ADN libre de células total, medido tal como se describe en el presente documento.

La figura 3 ilustra que el ADNlc-dd se reduce después del tratamiento de los receptores de trasplantes de corazón para el rechazo celular agudo con un aumento de la terapia inmunosupresora. Los datos se generaron usando plasma de receptores de trasplante de corazón recogidos en tubos de PPT. A la muestra del paciente se le asignó el estado R (rechazo, triángulo) o NR (no rechazo, círculo) basándose en la biopsia endomiocárdica realizada en la misma visita del paciente. El ADN libre de células derivado del donante se expresa como un porcentaje del ADN libre de células total, medido tal como se describe en el presente documento. Este paciente recibió inmunosupresión de dosis grandes con prednisona basándose en el estado de biopsia endomiocárdica de rechazo 2R (evento de índice a los 225 días tras el trasplante).

La figura 4 ilustra que el ADNlc-dd se reduce después del tratamiento de los receptores de trasplante de riñón para el rechazo celular agudo con un aumento de la terapia inmunosupresora. Los datos se generaron usando plasma de receptores de trasplante de riñón recogidos como sobrenadantes del procesamiento de CPT. A la muestra del paciente se le asignó R (rechazo, triángulo) basándose en los resultados de la biopsia, NR (no rechazo, círculos) basándose en la creatinina sérica baja. El ADN libre de células derivado del donante se expresa como porcentaje del ADN libre de células total, medido tal como se describe en el presente documento.

La figura 5 ilustra los valores de ADNlc-dd de los tubos de recogida de plasma Streck BCT después del trasplante de corazón. Las muestras de pacientes eran ciegas al estado o resultado de rechazo. Tres sujetos, tres visitas cada uno, cada uno un símbolo de forma diferente. El ADN libre de células derivado del donante se expresa como porcentaje del ADN libre de células total, medido tal como se describe en el presente documento.

La figura 6A-figura 6C ilustra que ADNlc-dd es una señal única del perfil de expresión génica de marcadores sanguíneos, y la combinación de ambos puede identificar mejor el rechazo. La figura 6A ilustra los niveles de ADNlc-dd de los receptores de trasplante de corazón. Los datos de ADNlc se generaron usando plasma de receptores de trasplante de corazón recogidos en tubos de PPT. A las muestras de pacientes se les asignó el estado R (rechazo) basándose en el estado de la biopsia endomiocárdica realizada en la misma visita del paciente. El ADN libre de células derivado del donante se expresa como porcentaje del ADN libre de células total, medido tal como se describe en el presente documento. La figura 6B ilustra los datos de AlloMap de los receptores de trasplantes en la figura 6A. Los datos de expresión génica se generaron usando células mononucleares recogidas usando tubos de CPT. La expresión génica se midió mediante pruebas de expresión molecular AlloMap. La figura 6C ilustra datos combinados de ADNlc-dd y datos de AlloMap. Los valores para ADNlc-dd (figura 6A) y AlloMap (figura 6B) se escalaron al mismo rango y se combinaron de manera aditiva. La puntuación combinada es mejor para discriminar el rechazo del no rechazo que o bien ADNlc o bien expresión génica sola, tal como se mide mediante el área bajo la curva de un gráfico de características de receptor-operador.

La figura 7 ilustra un flujo de trabajo a modo de ejemplo de los métodos de análisis de marcadores polimórficos descritos en el presente documento.

Descripción detallada

La siguiente descripción se presenta para permitir a un experto habitual en la técnica realizar y usar las diversas realizaciones. Se proporcionan descripciones de dispositivos, técnicas y aplicaciones específicos sólo como ejemplos. Diversas modificaciones en los ejemplos descritos en el presente documento resultarán fácilmente evidentes a los expertos habituales en la técnica. Por tanto, no se pretende que las diversas realizaciones se limiten a los ejemplos descritos y mostrados en el presente documento, sino que están de acuerdo con el alcance consistente con las reivindicaciones.

La presente divulgación se refiere a métodos de monitorización del estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante, así como a métodos de monitorización y ajuste de las terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante.

Visión general

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el desarrollo por el solicitante de técnicas para sondear el estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante. Los receptores de trasplantes contienen un aloinjerto que es extraño para el cuerpo del receptor. Esto desencadena una respuesta inmunitaria a partir del sistema inmunitario del receptor, que puede conducir a rechazo de trasplante agudo y/o crónico. Los métodos del solicitante implican el análisis de ADN libre de células (ADNlc) del receptor de trasplante para diagnosticar el estado del trasplante e informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que el rechazo de trasplante está asociado con la muerte de células en el tejido u órgano trasplantado (donante), que liberará ADN derivado del donante a partir de las células moribundas del donante, liberando así ADN libre de células derivado del donante (ADNlc-dd) al torrente sanguíneo del receptor. Para someter a ensayo del estado del aloinjerto en el receptor, puede extraerse ADN libre de células de una muestra del receptor, tal como un fluido corporal, y pueden secuenciarse diversos marcadores polimórficos, tales como loci de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), en donde el panel de marcadores polimórficos, tales como un panel de SNP, es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor (ADNlc-dr). Los marcadores polimórficos específicos seleccionados para estar en el panel incluyen los que se identifica que tienen bajas probabilidades de ser idénticos en dos cualesquiera individuos, haciéndolos por tanto apropiados para diferenciar entre ADN libre de células derivado del receptor y ADN libre de células derivado del donante. El número de marcadores polimórficos en el panel tal como, por ejemplo, el número de SNP en el panel, será suficiente para discriminar entre alelos del receptor y del donante incluso en individuos relacionados (excepto gemelos idénticos). Los patrones de distribución de alelos de marcadores polimórficos en el panel pueden someterse a ensayo para determinar la varianza en los patrones en comparación con los patrones de distribución homocigotos (es decir, el 0% o el 100% de cada alelo) o heterocigotos (es decir, el 50% de cada alelo) esperados, que pueden usarse para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante. No es necesario el genotipado individual del donante y el receptor para determinar qué alelo del locus polimórfico pertenece al donante y/o al receptor, ya que la varianza en el patrón de distribución de alelos marcadores polimórficos a partir de los patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados informa de la presencia de ADN libre de células derivado del donante en la población de moléculas de ADN libre de células aisladas del receptor de trasplante. En otras palabras, se supone que la señal mayoritaria de la muestra de ADN libre de células es ADN derivado del receptor y que la señal minoritaria es ADN derivado del donante, y esta información puede usarse para calcular los niveles de ADN derivado del donante en la muestra de ADN libre de células. Pueden usarse los cambios en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo para informar del estado del aloinjerto en el receptor de trasplante, así como para informar de una necesidad de ajustar o mantener una terapia inmunosupresora que se administra al sujeto.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos de monitorización del estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante, así como métodos de monitorización y/o ajuste de una terapia inmunosupresora que se administra o va a administrarse a un receptor de trasplante. La monitorización del estado de un aloinjerto implica analizar diversos aspectos que proporcionan información útil sobre el estado fisiológico del aloinjerto tal como, por ejemplo, el nivel de ADN libre de células derivado del donante en una muestra del receptor de trasplante. Los métodos de la presente divulgación pueden usarse para predecir el riesgo de rechazo de trasplante futuro tal como, por ejemplo, el riesgo de rechazo en el plazo de los siguientes 3-6 meses tras el análisis de muestras del receptor de trasplante. Los métodos de la presente divulgación pueden usarse también para diagnosticar o predecir el riesgo de disfunción del aloinjerto, tal como insuficiencia renal crónica o vasculopatía de aloinjerto cardíaco (CAV) (por ejemplo en el plazo de los siguientes 1-2 años tras el análisis de muestras del receptor de trasplante). Los métodos de la presente divulgación pueden usarse también para proporcionar una evaluación del estado inmunitario del receptor de trasplante, lo que puede usarse para guiar decisiones referentes a la terapia inmunosupresora en el receptor de trasplante. Los métodos de la presente divulgación pueden usarse también para guiar decisiones relacionadas con el ajuste de terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante. Beneficios y/o usos adicionales de los métodos de la presente divulgación resultarán evidentes para un experto en la técnica.

ADN libre de células

Los métodos de la presente divulgación implican el análisis de ADN libre de células de un receptor de trasplante para diagnosticar el estado del trasplante y/o para informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. ADN libre de células se refiere generalmente al ADN que está presente fuera de una célula tal como, por ejemplo, el ADN que está presente en un fluido corporal (por ejemplo sangre, plasma, suero, etc.) de un sujeto. El ADN libre de células puede haberse originado de varias ubicaciones dentro de una célula. El ADN libre de células puede haberse originado, por ejemplo, de ADN nuclear y ADN mitocondrial. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que el ADN libre de células se libera de las células por medio de apoptosis o necrosis de las células (es decir, muerte celular). Por consiguiente, y sin querer restringirse a la teoría, se cree que durante el rechazo del trasplante, la apoptosis o necrosis de las células trasplantadas (donante) dará como resultado la liberación de ADN libre de células derivado del donante en el fluido corporal de un receptor de trasplante. Los receptores de trasplantes que experimentan rechazo de trasplante pueden tener entonces una población de ADN libre de células en sus fluidos corporales, que incluye tanto su propio ADN libre de células endógeno (ADN libre de células derivado del receptor) como el ADN libre de células que se originó del donante (ADN libre de células derivado del donante). La determinación de un cambio en los niveles y/o en el ADN libre de células derivado del donante en un receptor de trasplante a lo largo del tiempo según los métodos de la presente divulgación puede usarse para diagnosticar el estado del aloinjerto e informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora.

El ARN libre de células también puede recogerse de un receptor de trasplante y analizarse mediante métodos análogos tal como se describió anteriormente y también el análisis de los niveles de ARN del receptor de genes marcadores específicos para diagnosticar el estado del trasplante y/o para informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. Por lo tanto, los métodos de la presente divulgación se refieren generalmente al análisis de ácidos nucleicos libres de células de un receptor de trasplante para diagnosticar el estado del trasplante y/o para informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante.

Sujetos y muestras

Los métodos de la presente divulgación implican proporcionar ADN libre de células a partir de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un aloinjerto de un donante. En este sentido, el sujeto es un receptor de trasplante que contiene un aloinjerto de un donante, y es normalmente un receptor de trasplante humano. El receptor de trasplante puede haber recibido uno o más de una variedad de aloinjertos de un donante. Los aloinjertos pueden incluir órganos trasplantados. Los órganos trasplantados pueden incluir, por ejemplo, un corazón, un riñón, un pulmón, un hígado, un páncreas, una córnea, un sistema de órganos u otros órganos sólidos. El trasplante recibido por el receptor de trasplante del donante también puede incluir también otros aloinjertos tales como, por ejemplo, un trasplante de médula ósea, células de los islotes pancreáticos, células madre, tejido de la piel, células de la piel o un xenotrasplante.

La muestra proporcionada puede incluir un fluido corporal aislado del receptor de trasplante. Las muestras obtenidas del receptor de trasplante contienen ADN libre de células, y el ADN total libre de células presente en la muestra puede ser totalmente ADN de libre de células derivado del receptor, o el ADN libre de células total presente en la muestra puede incluir una mezcla de ADN libre de células derivado del receptor y ADN libre de células derivado del donante. Las muestras pueden incluir un fluido corporal del receptor del trasplante tal como, por ejemplo, plasma, suero, sangre completa, sudor, lágrimas, saliva, fluido del flujo del oído, esputo, fluido de la suspensión de médula ósea, fluido linfático, orina, saliva, semen, flujo vaginal, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebral, ascitis, leche, secreciones del tracto respiratorio, y líquidos intestinales o del tracto genitourinario. En algunas realizaciones donde la muestra es plasma, puede obtenerse plasma derivado de la sangre venosa del receptor de trasplante.

Una vez que se obtiene una muestra, puede usarse directamente, congelarse o almacenarse de otra manera en una condición que mantenga la integridad del ADN libre de células durante cortos períodos de tiempo impidiendo la degradación y/o contaminación con ADN genómico u otros ácidos nucleicos. La cantidad de una muestra que se toma en un momento particular puede variar y puede depender de factores adicionales, tales como la necesidad de repetir el análisis de la muestra. En algunos aspectos, se obtienen hasta 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 ml de una muestra. En algunos aspectos, se obtiene 1-50, 2-40, 3-30 o 4-20 ml de muestra. En algunos aspectos, se obtienen más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 ml de una muestra.

Pueden tomarse muestras de un receptor de trasplante a lo largo de un período de tiempo (es decir, a lo largo de un intervalo de tiempo). El tiempo en que se toman las muestras del receptor de trasplante después del evento de trasplante puede variar. Las muestras pueden tomarse de un receptor de trasplante en diversos momentos y a lo largo de diversos períodos de tiempo para su uso en la determinación del estado del aloinjerto según los métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden tomarse muestras del receptor de trasplante en el plazo de días y semanas después, aproximadamente tres meses después, aproximadamente seis meses después, aproximadamente nueve meses después o menos de un año después del evento de trasplante. Pueden tomarse muestras del receptor de trasplante diversas veces antes del aniversario de un año del evento de trasplante, en el aniversario de un año del evento de trasplante o en diversas veces después del aniversario de un año del evento de trasplante. Por ejemplo, en el aniversario de un año después de un trasplante, puede comenzarse a tomar muestras del receptor de trasplante en

el mes 12 (es decir, el aniversario de un año del evento de trasplante) y se continúa tomando durante períodos de tiempo después de esto. En algunos aspectos, el período de tiempo para obtener muestras de un receptor de trasplante está dentro de los primeros pocos días después de producirse el trasplante del donante al receptor. Esto puede hacerse para monitorizar la terapia de inducción. En algunos aspectos, el período de tiempo para obtener muestras de un receptor de trasplante es durante la reducción gradual del régimen inmunosupresor, un período que se produce durante los primeros 12 meses después de producirse el trasplante del donante al receptor. En algunos aspectos, el período de tiempo para obtener muestras de un receptor de trasplante es durante todo el mantenimiento a largo plazo del régimen inmunosupresor, en cualquier momento más allá de los 12 meses después de producirse el trasplante del donante al receptor.

Cuando deben obtenerse múltiples muestras de un receptor de trasplante, la frecuencia del muestreo puede variar. Después de que haya comenzado a tomarse muestras de un receptor de trasplante, pueden obtenerse muestras aproximadamente una vez cada semana, aproximadamente una vez cada 2 semanas, aproximadamente una vez cada 3 semanas, aproximadamente una vez cada mes, aproximadamente una vez cada dos meses, aproximadamente una vez cada tres meses, aproximadamente una vez cada cuatro meses, aproximadamente una vez cada cinco meses, aproximadamente una vez cada seis meses, aproximadamente una vez al año o aproximadamente una vez cada dos años o más después del evento de muestreo inicial.

En algunos aspectos, a un receptor de trasplante se le toman muestras de líquido corporal durante de uno a tres meses consecutivos, comenzando en el aniversario de un año del evento de trasplante (es decir, 12 meses después del evento de trasplante), proporcionando un total de 4-6 muestras para el análisis tomadas a lo largo de un período de tiempo de tres meses, recogiendo las muestras aproximadamente cada dos semanas. En algunos aspectos, a un receptor de trasplante se le toman muestras de líquido corporal una vez a la semana durante de uno a tres meses consecutivos, comenzando en el aniversario de un año del evento de trasplante (es decir, 12 meses después del evento de trasplante), proporcionando un total de doce muestras para el análisis tomadas a lo largo de un período de tres meses. La duración total de la obtención de muestras de un receptor de trasplante, así como la frecuencia de obtención de tales muestras, pueden variar y dependerán de diversos factores, tales como el progreso clínico. Por ejemplo, un receptor de trasplante puede tener muestras obtenidas para el análisis de ADN libre de células durante la duración de su vida útil. El momento y la frecuencia apropiados del muestreo podrá determinarlos un experto en la técnica para un receptor de trasplante dado.

Análisis del ADN libre de células en un receptor de trasplante

Los métodos de la presente divulgación implican el análisis de ADN libre de células de un receptor de trasplante. Después de haberse aislado ADN libre de células de un receptor de trasplante, pueden utilizarse diversos métodos y técnicas para analizar el ADN libre de células. El análisis del ADN libre de células según los métodos de la presente divulgación implica el análisis de un panel de marcadores polimórficos a partir del ADN libre de células. En algunas realizaciones, los marcadores polimórficos son polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). En algunas realizaciones, los SNP se seleccionan para incluirse en el panel al menos en parte basándose en que el panel de SNP será suficiente para diferenciar entre el ADN libre de células derivado del donante y el ADN libre de células derivado del receptor.

Paneles de marcadores polimórficos

El análisis de ADN libre de células obtenido de un receptor de trasplante implica el análisis de un panel de marcadores polimórficos a partir del ADN libre de células. Pueden seleccionarse diversos marcadores polimórficos para su inclusión en el panel que va a analizarse siempre que el panel de marcadores polimórficos en su totalidad sea adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor. Puede usarse el mismo panel de marcadores polimórficos para cada receptor de trasplante; no hay necesidad de adaptar los paneles de marcadores polimórficos para individualizar el panel a diferentes receptores de trasplantes.

Pueden incluirse diversos tipos de marcadores polimórficos en paneles de marcadores polimórficos. Se encuentran marcadores polimórficos en una región del ADN que contiene un polimorfismo. Un polimorfismo se refiere generalmente a la aparición de dos o más alelos o secuencias alternativas determinadas genéticamente en una población. Un sitio o marcador polimórfico es el locus en el que se produce la divergencia, o el polimorfismo. Un polimorfismo puede contener, por ejemplo, uno o más cambios de bases, una inserción, una repetición o una delección. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases, tal como un SNP. Los marcadores polimórficos pueden incluir, por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), repeticiones en tándem cortas (STR), número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótido, repeticiones de trinucleótido, repeticiones de tetranucleótido, repeticiones de secuencia sencilla y elementos de inserción. Los marcadores polimórficos pueden contener una o más bases modificadas por metilación. Tipos adicionales de polimorfismos y marcadores polimórficos resultarán evidentes para un experto en la técnica. Un polimorfismo entre dos ácidos nucleicos puede producirse de manera natural, o puede estar provocado por la exposición a o el contacto con productos químicos, enzimas u otros agentes, o la exposición a agentes que provocan daño en ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, radiación

ultravioleta, mutágenos o carcinógenos.

Pueden usarse diversas combinaciones de tipos de marcadores polimórficos en paneles de marcadores polimórficos. Por ejemplo, el panel de marcadores polimórficos puede incluir tanto SNP como repeticiones en tándem cortas, o cualquier otro tipo de marcador polimórfico. En algunas realizaciones, el panel de marcadores polimórficos se compone totalmente de SNP; por tanto, el panel de marcadores polimórficos es un panel de SNP. Combinaciones adicionales de marcadores polimórficos en paneles de marcadores polimórficos resultarán evidentes para un experto en la técnica.

La selección de la cantidad e identidad apropiadas de marcadores polimórficos que van a analizarse a partir de ADN libre de células puede variar, tal como apreciará un experto en la técnica. El panel de marcadores polimórficos que va a analizarse puede incluir al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 105, al menos 110, o al menos 115, al menos 120, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 1.000 o al menos 1.500 o más marcadores polimórficos independientes.

En algunas realizaciones, el panel de marcadores polimórficos es un panel de SNP. Los SNP que van a incluirse en el panel de SNP, o en cualquier otro panel de marcadores polimórficos, pueden ser los identificados anteriormente como adecuados para diferenciar entre dos cualesquiera individuos no relacionados (Pakstis *et al.*, 2010). Por ejemplo, el panel de SNP puede incluir uno o más de los siguientes SNP humanos (nombrados según la numeración de dbSNP): rs1004357, rs10092491, rs1019029, rs1027895, rs10488710, rs10500617, rs1058083, rs10768550, rs10773760, rs10776839, rs1109037, rs12480506, rs1294331, rs12997453, rs13134862, rs13182883, rs13218440, rs1336071, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1490413, rs1498553, rs1523537, rs1554472, rs159606, rs1736442, rs1821380, rs1872575, rs2046361, rs2073383, rs214955, rs2175957, rs221956, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2342747, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs279844, rs2811231, rs2833736, rs2920816, rs315791, rs321198, rs338882, rs3744163, rs3780962, rs4288409, rs430046, rs4364205, rs445251, rs4530059, rs4606077, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs560681, rs5746846, rs576261, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs6811238, rs689512, rs6955448, rs7041158, rs7205345, rs722290, rs7229946, rs740598, rs7520386, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs9905977, rs993934 y rs9951171.

Los SNP pueden seleccionarse también basándose en que tengan, por ejemplo, una frecuencia de alelo minoritario en la población global de >0,4, una frecuencia de alelo minoritario en la población diana de >0,4, la tasa de error de polimerasa más baja (en el sistema de prueba) de las 6 posibles transiciones o transversiones de alelos y baja unión en el genoma tal como, por ejemplo, una distancia >500 kb entre SNP.

El panel de SNP puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes SNP humanos (nombrados según la numeración de dbSNP): rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977029, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. En algunas realizaciones, cada uno de los 266 SNP mencionados anteriormente se incluye en el panel de marcadores polimórficos que va a analizarse a partir de ADN libre de células.

El panel de SNP puede incluir, por ejemplo, al menos al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 105, al menos 110, o al menos 115, al menos 120, al menos 150, al menos 200, al menos 205, al menos 210, al menos 215, al menos 220, al menos 225, al menos 230, al menos 235, al menos 240, al menos 245, al menos 250, al menos 255, al menos 260 o al menos 265 de los 266 SNP independientes identificados anteriormente.

El panel de SNP puede incluir, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40, de aproximadamente 40 a aproximadamente 50, de aproximadamente 50 a aproximadamente 60, de aproximadamente 60 a aproximadamente 70, de aproximadamente 70 a aproximadamente 80, de aproximadamente 80 a aproximadamente 90, de aproximadamente 90 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 110, de aproximadamente 110 a aproximadamente 120, de aproximadamente 120 a aproximadamente 130, de aproximadamente 130 a aproximadamente 140, de aproximadamente 140 a aproximadamente 150, de aproximadamente 150 a aproximadamente 160, de aproximadamente 160 a aproximadamente 170, de aproximadamente 170 a aproximadamente 180, de aproximadamente 180 a aproximadamente 190, de aproximadamente 190 a aproximadamente 200, de aproximadamente 200 a aproximadamente 210, de aproximadamente 210 a aproximadamente 220, de aproximadamente 220 a aproximadamente 230, de aproximadamente 230 a aproximadamente 240, de aproximadamente 240 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 260 o de aproximadamente 250 a aproximadamente 266 de los 266 SNP independientes identificados anteriormente.

El panel de SNP puede incluir, por ejemplo, de aproximadamente 195 a aproximadamente 200, de aproximadamente 200 a aproximadamente 205, de aproximadamente 210 a aproximadamente 215, de aproximadamente 215 a aproximadamente 220, de aproximadamente 220 a aproximadamente 225, de aproximadamente 225 a aproximadamente 230, de aproximadamente 230 a aproximadamente 235, de aproximadamente 235 a aproximadamente 240, de aproximadamente 240 a aproximadamente 245, de aproximadamente 245 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 255, de aproximadamente 255 a aproximadamente 260, de aproximadamente 260 a aproximadamente 265 o de aproximadamente 260 a aproximadamente 266 de los 266 SNP independientes identificados anteriormente.

Amplificación y secuenciación

El ADN libre de células aislado de un receptor de trasplante puede amplificarse para análisis y técnicas posteriores, tales como análisis de un panel de marcadores polimórficos a partir del ADN libre de células. En la técnica se conocen bien diversos métodos y protocolos para la extracción de ADN y se describen en el presente documento (véase por ejemplo *Current Protocols in Molecular Biology*, última edición). El ADN libre de células puede extraerse usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp u otros kits disponibles comercialmente apropiados. Se conocen bien otros métodos a modo de ejemplo de extracción de ADN libre de células (véanse, por ejemplo, *Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. Clin. Chem. 2008, v. 54, págs.1000-1007*; *Prediction of MYCN Amplification in Neuroblastoma Using Serum DNA and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. JCO 2005, v. 23, págs. 5205-5210*; *Circulating Nucleic Acids in Blood of Healthy Male and Female Donors. Clin. Chem. 2005, v. 51, págs. 1317-1319*; *Use of Magnetic Beads for Plasma cell-free DNA Extraction: Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics. Clin. Chem. 2003, v. 49, págs. 1953-1955*; Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, Leung TN, Wong EMC, Lo YMD. *Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. Clin Chem 2001; 47: 1607-1613*; y Swinkels *et al.* *Effects of Blood-Processing Protocols on Cell-free DNA Quantification in Plasma. Clinical Chemistry, 2003, vol. 49, n.º 3, 525-526*).

En la técnica se conocen de manera similar métodos de amplificación de ADN y se describen en el presente documento. La amplificación se refiere generalmente a cualquier dispositivo, método o técnica que pueda generar copias de un ácido nucleico. La amplificación de ADN libre de células puede implicar, por ejemplo, técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como amplificación lineal (véase el documento USPN 6.132.997), amplificación por círculo rodante, y similares. El ADN libre de células puede amplificarse para su uso en análisis posteriores del ADN mediante, por ejemplo, PCR digital o secuenciación. Puede usarse el sistema Fluidigm Access Array™, el sistema RainDrop de RainDance Technologies u otras tecnologías para la amplificación múltiple para la amplificación de ADN múltiples o simples altamente en paralelo. La amplificación puede implicar el uso de polimerasas de alta fidelidad tales como, por ejemplo, FastStart High Fidelity (Roche), Expand High Fidelity (Roche), Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific), KAPA HiFi (Kapa BioSystems) o KAPA2G (Kapa Biosystems).

La amplificación puede incluir un ciclo de PCR inicial que añade una secuencia única a cada molécula individual, denominado indexación molecular. La indexación molecular permite la evaluación cuantitativa del nivel absoluto de ambos alelos para cada amplicón de SNP y por tanto puede mejorar la precisión y exactitud de la determinación del porcentaje de ADN libre de células derivado del donante.

El ADN amplificado puede someterse también a procesos adicionales, tales como indexación (también denominado etiquetado o marcaje con código de barras). En la técnica se conocen bien métodos de indexación de ADN y se describen en el presente documento. La indexación permitirá el uso de plataformas de secuenciación múltiplex, que son compatibles con una variedad de sistemas de secuenciación, tales como HiSeq, MiSeq de Illumina e Ion PGM e Ion Proton de ThermoFisher Scientific. La secuenciación múltiplex permite la secuenciación de ADN a partir de múltiples muestras de una vez a través del uso de indexación de ADN para identificar específicamente la fuente de muestra del ADN secuenciado.

La cantidad de ADN que se usa para el análisis puede variar. En algunos aspectos, se obtienen menos de 1 pg, 5 pg, 10 pg, 20 pg, 30 pg, 40 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg o 1 mg de ADN a partir de la muestra para el análisis genético adicional. En algunos casos, se obtienen aproximadamente 1-5 pg, 5-10 pg, 10-100 pg, 100 pg-1 ng, 1-5 ng, 5-10 ng, 10-100 ng o 100 ng-1 µg de ADN a partir de la muestra para análisis genético adicional.

Los métodos de la presente divulgación implican secuenciar loci diana a partir de ADN libre de células, así como analizar los datos de secuencia. En la técnica se conocen bien diversos métodos y protocolos para la secuenciación y el análisis de ADN y se describen en el presente documento. Por ejemplo, puede lograrse la secuenciación de ADN usando técnicas de secuenciación de ADN de alto rendimiento. Los ejemplos de secuenciación de última generación y alto rendimiento incluyen, por ejemplo, secuenciación de firmas masivamente en paralelo, secuenciación con polonio, pirosecuenciación 454, secuenciación de Illumina (Solexa) con HiSeq, MiSeq y otras plataformas, secuenciación SOLiD, secuenciación con semiconductores iónicos (Ion Torrent), secuenciación de nanobola de ADN, secuenciación de una sola molécula Heliscope, secuenciación en tiempo real de una sola molécula (SMRT), MassARRAY® y Análisis Digital de Regiones Seleccionadas (DANSR™). Véanse, por ejemplo, Stein RA (1 de septiembre de 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 de enero de 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 de enero de 2012). "Comparison of Next-Generation Sequencing Systems". *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1-11; Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY®). *Methods Mol Biol.* 2009;578:307-43; Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. A novel approach toward the challenge of accurately quantifying fetal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2010;30: 1226-9; y 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). De manera similar, en la técnica se conocen bien programas de software y análisis secundario de datos de secuencia.

Cuando hay múltiples muestras de ADN libre de células a partir de un receptor de trasplante que van a secuenciarse, tal como cuando se toman múltiples muestras del receptor de trasplante a lo largo del tiempo, cada muestra puede secuenciarse individualmente, o múltiples muestras pueden secuenciarse juntas usando secuenciación múltiplex.

Análisis de los patrones de distribución de alelos marcadores polimórficos y determinación del nivel de ADN libre de células derivado del donante

Los métodos de la presente divulgación implican someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos marcadores polimórficos en un panel de marcadores polimórficos en comparación con los patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados. El análisis de estos patrones permite la determinación del nivel de ADN libre de células derivado del donante en una muestra de ADN libre de células obtenida de un receptor de trasplante.

Generalmente, un individuo contiene ADN que es o bien homocigoto o bien heterocigoto para un marcador polimórfico dado, tal como un SNP. Un individuo puede ser homocigoto para un alelo de un marcador polimórfico dado y contendrá el 100% de un alelo de ese marcador polimórfico y contendrá el 0% del otro alelo de ese marcador polimórfico (por ejemplo el 100% del alelo A para un marcador polimórfico dado, el 0% del alelo B para un marcador polimórfico dado). Un individuo también puede ser heterocigoto para un marcador polimórfico dado, y por tanto contendrá el 50% del alelo A y el 50% del alelo B de ese marcador polimórfico. Por consiguiente, si todo el ADN en una muestra se originó a partir de un solo individuo, se espera que cualquier marcador polimórfico dado en el ADN en esa muestra presentará un patrón de distribución homocigoto (es decir, el 100% de un alelo, 0% del otro alelo) o un patrón de distribución heterocigoto (es decir, el 50% de un alelo y el 50% del otro alelo). Sin embargo, si una muestra de ADN contiene ADN que se originó a partir de más de un individuo (por ejemplo una muestra de ADN libre de células muestra de un receptor de trasplante que contiene tanto ADN derivado del receptor como ADN derivado del donante), entonces las distribuciones de alelos de marcadores polimórficos pueden variar, para un marcador polimórfico dado, de los patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados. Esto es así porque dos individuos pueden no compartir necesariamente la misma cigosidad para un marcador polimórfico dado (por ejemplo, el individuo 1 es homocigoto para un alelo dado de un marcador polimórfico dado, y el individuo 2 es heterocigoto para los alelos de ese mismo marcador polimórfico). Cuando se produce esto, puede observarse varianza en los patrones de distribución de alelos

esperados en comparación con los patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados. Esta varianza puede usarse para evaluar si está presente ADN extraño en una muestra de ADN de un solo individuo. Con respecto a los métodos de la presente divulgación, se usa la varianza en los patrones de distribución de alelos marcadores polimórficos en el panel de marcadores polimórficos en comparación con los patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en la muestra de ADN libre de células obtenida de un receptor de trasplante.

Cuando se analizan datos de secuencia de marcadores polimórficos a partir de ADN libre de células según los métodos de la presente divulgación, puede observarse una señal mayoritaria a partir de un alelo de un marcador polimórfico y puede observarse una señal minoritaria a partir de un alelo de un marcador polimórfico. Con respecto al ADN libre de células aislado de un receptor de trasplante, puesto que se supone que la mayoría del ADN en la muestra de ADN libre de células a partir del receptor de trasplante se originaba a partir del propio ADN endógeno del receptor, se supone adicionalmente que la señal mayoritaria representa un alelo de un marcador polimórfico que se originaba a partir de ADN libre de células derivado del receptor, mientras que la señal minoritaria representa un alelo de un marcador polimórfico que se originaba a partir de ADN libre de células derivado del donante. Se supone que marcadores polimórficos tales como SNP, por ejemplo, con una distribución uniforme de ambos alelos, se han originado ambos en gran medida a partir del receptor. Desviaciones de la distribución uniforme indicarán la influencia de los alelos a partir del ADN libre de células derivado del donante.

Pueden realizarse diversos cálculos basándose en la determinación de alelos a partir de los datos de secuencia. Por ejemplo, los métodos de la presente divulgación pueden implicar el cálculo de diversas concentraciones de ADN libre de células, o porcentajes del mismo, de una cantidad total de ADN libre de células. Globalmente, puesto que se supone que la señal mayoritaria a partir del ADN libre de células en una muestra aislada de un receptor de trasplante es ADN derivado del receptor y que la señal minoritaria es ADN derivado del donante, puede usarse esta información para calcular un porcentaje de ADN derivado del donante en la muestra de ADN libre de células.

Tal como se describió anteriormente, no es necesario el genotipado individual del donante y el receptor para determinar qué alelo del marcador polimórfico pertenece al donante y/o el receptor, ya que la varianza en el patrón de distribución de alelos marcadores polimórficos a partir de los patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados informa de la presencia de ADN libre de células derivado del donante en la población de moléculas de ADN libre de células aisladas del receptor de trasplante. Por consiguiente, el nivel de ADN libre de células derivado del donante en una muestra obtenida de un receptor de trasplante puede determinarse sin usar la información de genotipo del receptor de trasplante, del donante de trasplante y/o cualquier otra información de genotipo de cualquier fuente. Tal información de genotipo que no es necesario considerar incluye, por ejemplo, el genotipo a través del genoma en su totalidad o porciones del mismo, o el genotipo en los marcadores polimórficos particulares que están analizándose. En algunas realizaciones, no se realiza genotipado individual del receptor de trasplante. En algunas realizaciones, no se realiza genotipado individual del donante de trasplante. En algunas realizaciones, ni el receptor de trasplante ni el donante de trasplante se someten a genotipado individual. En algunas realizaciones, no se considera la información de genotipo del receptor de trasplante cuando se determinan los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra obtenida de un receptor de trasplante. En algunas realizaciones, no se considera la información de genotipo del donante de trasplante cuando se determinan los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra obtenida de un receptor de trasplante. En algunas realizaciones, se determinan los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra obtenida de un receptor de trasplante sin consideración de la información de genotipo del receptor de trasplante y sin consideración de la información de genotipo del donante de trasplante. En algunas realizaciones, el nivel de ADN libre de células derivado del donante en una muestra obtenida de un receptor de trasplante puede determinarse sin el uso de la información de genotipo.

Las mejoras en los cálculos pueden incluir estimar y restar un nivel de señal debida a amplificación o error de secuenciación para mejorar la exactitud y precisión. Por ejemplo, puede usarse un subconjunto de SNP elegido adecuadamente para estimar una suma, media, mediana o desviación estándar del subconjunto para producir un cálculo del nivel global de ADN libre de células derivado del donante. Múltiples muestras del mismo sujeto en un tiempo de muestreo dado tendrán el mismo patrón de distribuciones polimórficas a través de los SNP, que pueden usarse para mejorar la estimación de ADN libre de células derivado del donante en muestras individuales de ese sujeto.

La cantidad de ADN libre de células derivado del donante presente en la muestra de ADN libre de células puede expresarse de una variedad de formas. En algunos aspectos, la cantidad de una o más moléculas de ADN de ADN libre de células derivado del donante se determina como un porcentaje de las moléculas de ADN totales en la muestra. En algunos aspectos, la cantidad de una o más moléculas de ADN de ADN libre de células derivado del donante se determina como una razón del ADN total en la muestra. En algunos aspectos, la cantidad de una o más moléculas de ADN de ADN libre de células derivado del donante se determina como una razón o porcentaje en comparación con una o más moléculas de ADN de referencia en la muestra. Por ejemplo, puede determinarse que la cantidad total de ADN libre de células derivado del donante es el 10% de las moléculas de ADN totales en la muestra de ADN libre de células. Alternativamente, la cantidad total de ADN libre de células derivado del donante puede estar en una razón de 1:10 en comparación con las moléculas de ADN totales en la muestra de ADN libre de células. En algunos aspectos, la cantidad de una o más moléculas de ADN del ADN libre de células derivado del donante puede determinarse como una concentración. Por ejemplo, puede determinarse que la cantidad total de ADN libre de células derivado del donante

en la muestra de ADN libre de células es de 1 µg/ml. Los valores descritos en el presente documento son meramente a modo de ejemplo para ilustrar diversos modos para expresar cantidades de ADN libre de células derivado del donante. El porcentaje de ADN libre de células derivado del donante en la muestra de ADN libre de células de un receptor de trasplante puede ser extremadamente bajo (por ejemplo a o por debajo del 0,5% del contenido de ADN total de la muestra de ADN libre de células). Se indica que la cantidad de ADN libre de células derivado del receptor en la muestra de ADN libre de células puede expresarse también de las maneras descritas para ADN libre de células derivado del donante. Métodos adicionales de expresión de la cantidad de una fuente, tipo o secuencia dada de molécula de ADN en una muestra de ADN libre de células resultarán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

Las realizaciones y los aspectos de la presente divulgación descritos anteriormente pueden implementarse de varios modos. Por ejemplo, algunos aspectos de las realizaciones y los aspectos pueden implementarse utilizando hardware, software o una combinación de los mismos. Cuando se implementa en el software, el código del software puede ejecutarse en cualquier procesador o conjunto de procesadores adecuado, ya se proporcione en un solo ordenador o se distribuya entre varios ordenadores. Debe apreciarse que cualquier componente o colección de componentes que realizan las funciones descritas anteriormente pueden considerarse genéricamente como uno o más controladores que controlan las funciones comentadas anteriormente. El uno o más controladores pueden implementarse de varios modos, como con hardware dedicado o con hardware de propósito general (por ejemplo, uno o más procesadores) que se programan usando microcódigo o software para realizar las funciones mencionadas anteriormente.

A este respecto, debe indicarse que la implementación de varias características de la presente divulgación puede usar al menos un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio (por ejemplo, una memoria de ordenador, un disquete, un disco compacto, una cinta, etc.) codificados con un programa informático (es decir, una pluralidad de instrucciones) que, cuando se ejecuta en un procesador, realiza las funciones comentadas anteriormente. El medio de almacenamiento legible por ordenador puede ser transportable de manera que el programa almacenado en el mismo pueda cargarse en cualquier recurso informático para implementar determinados aspectos de la presente divulgación comentada en el presente documento. Además, debe indicarse que la referencia a un programa informático que, cuando se ejecuta, realiza las funciones mencionadas anteriormente, no se limita a un programa de aplicación que se ejecuta en un ordenador principal. Más bien, el término programa informático se usa en el presente documento en un sentido genérico para hacer referencia a cualquier tipo de código informático (por ejemplo, software o microcódigo) que puede emplearse para programar un procesador para implementar determinados aspectos de la presente divulgación.

Determinación del estado de un aloinjerto

Los métodos de la presente divulgación para determinar los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra de un receptor de trasplante pueden usarse para determinar el estado del aloinjerto en el receptor de trasplante. En general, cambios en los niveles de ADN libre de células derivado del donante más allá de un valor umbral adecuado en el receptor de trasplante a lo largo del tiempo son informativos con respecto al estado del aloinjerto.

Un umbral o valor umbral se refiere generalmente a cualquier nivel predeterminado o intervalo de niveles que es indicativo de la presencia o ausencia de un estado o la presencia o ausencia de un riesgo. El valor umbral puede adoptar una variedad de formas. Puede ser un solo valor de corte, tal como una mediana o media. Como otro ejemplo, puede determinarse un valor umbral a partir de los valores de nivel inicial antes de la presencia de un estado riesgo o después de un ciclo de tratamiento. Un nivel inicial de este tipo puede ser indicativo de un estado normal u otro en el sujeto no correlacionado con el riesgo o estado que está sometiéndose a prueba. Por ejemplo, el valor de nivel inicial puede ser el nivel de ADN libre de células derivado del donante en muestras de un receptor de trasplante antes del evento de trasplante real, que sería presumiblemente de cero o insignificante, pero también puede indicar el error de nivel inicial en el sistema. En algunos aspectos, el valor umbral puede ser un valor de nivel inicial del sujeto que está sometiéndose a prueba. El valor umbral, en lo que se refiere a la demarcación de cambios significativos en los niveles de ADN libre de células derivado del donante en un receptor de trasplante, puede variar considerablemente. Un experto en la técnica reconocería parámetros y medios apropiados para determinar cambios significativos en los niveles de ADN libre de células derivado del donante en un receptor de trasplante a lo largo del tiempo. Una vez seleccionados parámetros de análisis apropiados, la determinación de cambios en el nivel de ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante a lo largo de un periodo de tiempo puede informar del estado del aloinjerto.

En algunas realizaciones, un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante a lo largo del tiempo es indicativo de rechazo de trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora, nefrotoxicidad del tratamiento inmunosupresor, infección y/o una necesidad de investigación adicional del estado del aloinjerto. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que si el nivel de ADN libre de células derivado del donante aumenta en un receptor de trasplante a lo largo del tiempo, entonces las células del aloinjerto están experimentando cada vez más apoptosis y/o necrosis a lo largo del tiempo, lo que es indicativo de rechazo de trasplante.

En algunas realizaciones, una disminución en los niveles del ADN libre de células derivado del donante en el receptor

de trasplante a lo largo del tiempo es indicativo de tolerancia al trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del aloinjerto. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que si el nivel de ADN libre de células derivado del donante disminuye en un receptor de trasplante a lo largo del tiempo, entonces las células del aloinjerto están experimentando cada vez menos apoptosis y/o necrosis a lo largo del tiempo, lo que es indicativo de tolerancia al trasplante, inmunosupresión excesiva o inmunosupresión apropiada.

En algunas realizaciones, ningún cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante a lo largo del tiempo es indicativo de estado de rechazo de trasplante estable y/u oportunidad de ajuste de la terapia inmunosupresora. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que si el nivel de ADN libre de células derivado del donante no cambia en un receptor de trasplante a lo largo del tiempo, entonces las células del aloinjerto están experimentando un nivel en estado estacionario de apoptosis a lo largo del tiempo, lo que es indicativo de un estado de rechazo de trasplante estable. Un estado de rechazo de trasplante estable informa del estado del aloinjerto durante la ventana de tiempo analizada, pero no informa de la dirección, o bien hacia el rechazo o bien hacia la tolerancia, hacia la que progresa el aloinjerto. Por ejemplo, el aloinjerto puede estar experimentando rechazo activo en el receptor de trasplante, pero un estado de rechazo de trasplante estable indica que la tasa de rechazo de aloinjerto no cambia durante el tiempo en que se analizó (es decir, la tasa de rechazo de trasplante no aumenta ni disminuye). De manera similar, el aloinjerto puede estar experimentando tolerancia activa en el receptor de trasplante, pero un estado de rechazo de trasplante estable indica que la tasa de tolerancia de aloinjerto no cambia durante el tiempo en que se analizó (es decir, la tasa de tolerancia al trasplante no aumenta ni disminuye).

Ajuste de la terapia inmunosupresora

Los métodos de la presente divulgación para determinar los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra de un receptor de trasplante pueden usarse para informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. En general, cambios en los niveles de ADN libre de células derivado del donante más allá de un valor umbral adecuado en el receptor de trasplante a lo largo del tiempo son informativos con respecto a la determinación de una necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante.

Terapia inmunosupresora se refiere generalmente a la administración de un inmunosupresor u otro agente terapéutico que suprime las respuestas inmunitarias en un sujeto. Los agentes inmunosupresores a modo de ejemplo pueden incluir, por ejemplo, anticoagulantes, antipalúdicos, fármacos cardiacos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y esteroides incluyendo, por ejemplo, inhibidores de Ace, aspirina, azatioprina, B7RP-1-fc, β -bloqueantes, brequinar sódico, campath-1H, celecoxib, cloroquina, corticosteroides, cumadina, ciclofosfamida, ciclosporina A, DHEA, desoxispergualina, dexametasona, diclofenaco, dolobid, etodolaco, everolímús, FK778, feldeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, heparina, hidralazina, hidroxicloquina, inmunoglobulina CTLA-4 o LFA3, ibuprofeno, indometacina, ISAtx-247, ketoprofeno, ketorolaco, leflunomida, meclofenamato, ácido mefenámico, mepacrina, 6-mercaptopurina, meloxicam, metotrexato, mizoribina, micofenolato mofetilo, naproxeno, oxaprozina, Plaquenil, NOX-100, prednisona, metiprenisona, rapamicina (sirolímús), sulindaco, tacrolímús (FK506), timoglobulina, tolmetina, tresperímús, UO126 y anticuerpos incluyendo, por ejemplo, anticuerpos frente a linfocitos alfa, adalimumab, anticuerpos anti-CD3, anti-CD25, anti-CD52 anti-IL2R y anti-TAC, basiliximab, daclizumab, etanercept, hu5C8, infliximab, OKT4 y natalizumab.

En algunas realizaciones, un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante a lo largo del tiempo es indicativo de la necesidad de aumentar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. La decisión de aumentar la terapia inmunosupresora que se administra a un receptor de trasplante puede basarse en factores clínicos adicionales, tales como la salud del receptor de trasplante. En algunos aspectos, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se aumenta.

En algunas realizaciones, una disminución en los niveles del ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante a lo largo del tiempo es indicativo de la necesidad de disminuir la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. La decisión de disminuir la terapia inmunosupresora que se administra a un receptor de trasplante puede basarse en factores clínicos adicionales, tales como la salud del receptor de trasplante. En algunos aspectos, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se disminuye.

En algunas realizaciones, ningún cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante a lo largo del tiempo es indicativo de que no es necesario ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante, o que la terapia inmunosupresora que se administra puede mantenerse. La decisión de mantener la terapia inmunosupresora que se administra a un receptor de trasplante puede basarse en factores clínicos adicionales, tales como la salud del receptor de trasplante. En algunos aspectos, la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se mantiene.

En algunas realizaciones, el ajuste de la terapia inmunosupresora incluye cambiar el tipo o la forma de inmunosupresor u otra terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. En algunas realizaciones en donde el receptor de trasplante no está recibiendo terapia inmunosupresora, los métodos de la presente divulgación pueden indicar la necesidad de administrar terapia inmunosupresora al receptor de trasplante.

Debe indicarse que los niveles de ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante pueden no ser el único factor tomado en consideración cuando se determina la necesidad o falta de la misma de ajustar una terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante. Por ejemplo, para un receptor de trasplante que presenta tanto niveles crecientes de ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo como gravedad creciente de una infección, puede no ser aconsejable aumentar o incluso mantener la terapia inmunosupresora actual. Debe indicarse por tanto que la terapia inmunosupresora que se administra a un receptor de trasplante puede aumentarse, disminuirse o mantenerse independientemente de los niveles predeterminados de ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante dependiendo de la presencia o ausencia de otros factores clínicos de control.

Análisis adicionales

Los métodos de la presente divulgación pueden realizarse además de o conjuntamente con otros análisis de muestras de un receptor de trasplante para diagnosticar el estado del aloinjerto y/o para informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto.

En algunas realizaciones, se somete a prueba la presencia o los niveles de un agente infeccioso en el receptor de trasplante. Los agentes infecciosos que pueden someterse a prueba incluyen, por ejemplo, virus; bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Nocardia*, *Streptococcus pneumonia*, *Staphiloccous aureus* y *Legionella*; hongos tales como *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis carinii*, o parásitos tales como *Toxoplasma gondii*.

En algunas realizaciones, se somete a prueba la presencia o los niveles de agentes infecciosos virales en el receptor de trasplante. Pueden analizarse biomarcadores virales en ácido nucleico obtenido de una muestra del receptor de trasplante para determinar la presencia o los niveles de virus en el receptor de trasplante. Los virus que pueden someterse a prueba incluyen, por ejemplo, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, Anelloviridae y virus BK. Los resultados de las pruebas para determinar la presencia o los niveles de virus pueden usarse para clasificar el estado inmunitario del receptor de trasplante y para determinar el estado de infección en el receptor de trasplante. En algunas realizaciones, las terapias inmunosupresoras se disminuyen, o al menos no se aumentan, en receptores de trasplantes que se clasifican como que tienen un alto riesgo de infección clínicamente significativa. En algunas realizaciones, las terapias inmunosupresoras se aumentan, o al menos no se disminuyen, en receptores de trasplantes que se clasifican como que tienen un bajo riesgo de infección clínicamente significativa. Debe indicarse que otros factores clínicos pueden informar de decisiones para ajustar terapias inmunosupresoras, un receptor de trasplante puede tener una terapia inmunosupresora que se administra actualmente al mismo aumentada, disminuida o mantenida independientemente de los resultados de las pruebas para determinar la presencia o los niveles de virus y/o la clasificación para el riesgo de infección clínicamente significativa.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación también implican realizar una prueba AlloMap para ayudar en la determinación del estado del aloinjerto en un receptor de trasplante. Las pruebas AlloMap implican realizar ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) usando ARN que se ha aislado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se analiza la expresión de un número selecto de genes y estos datos de expresión génica se usan para proporcionar información referente al estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante. La prueba AlloMap se conoce en la técnica. Los resultados de una prueba Allo-Map pueden usarse conjuntamente con los métodos de la presente divulgación, con o sin un método para definir una sola puntuación a partir de las pruebas combinadas, para determinar el estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante y/o informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante.

En algunos aspectos, los métodos de la presente divulgación implican determinar una puntuación de combinación que puede usarse para transmitir el estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante. Las puntuaciones de combinación se calculan generalmente basándose en los resultados de múltiples ensayos (por ejemplo dos o más) usados para sondear el estado del aloinjerto en el receptor de trasplante. Por ejemplo, pueden calcularse puntuaciones de combinación basándose en los niveles determinados de ADN libre de células derivado del donante en el receptor de trasplante y basándose en los resultados de un ensayo de obtención del perfil de expresión génica tal como, por ejemplo, una prueba AlloMap, que mide la expresión génica selecta. Pueden calcularse puntuaciones de combinación basándose en una sola muestra tomada de un receptor de trasplante, o pueden basarse en muestras tomadas de un receptor de trasplante a lo largo de un intervalo de tiempo. Las puntuaciones de combinación pueden usarse para determinar el estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante y/o informar de la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al receptor de trasplante.

Pueden usarse también análisis de biomarcadores adicionales, ensayos de expresión génica y otros ensayos para diagnosticar el estado de un aloinjerto en un receptor de trasplante y/o determinar la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora además de o conjuntamente con los métodos de la presente divulgación, con o sin un método para definir una sola puntuación a partir de las pruebas combinadas, lo que será fácilmente evidente para un experto en la técnica.

Pueden realizarse análisis adicionales para identificar marcadores de nuevos cánceres, metastásicos o recurrentes, en receptores de trasplantes. Pueden diseñarse cebadores para amplificar regiones en donde se sabe que se producen mutaciones genéticas para proporcionar una detección temprana del cáncer mediante la identificación de mutaciones conocidas asociadas a tumores. Esto puede ser ventajoso al menos en parte porque los receptores de trasplantes pueden correr un riesgo aumentado de desarrollar determinados tumores malignos debido a una inmunosupresión excesiva.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar las realizaciones proporcionadas y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1-Análisis de ADN libre de células para determinar el estado de un órgano trasplantado en un receptor de trasplante y determinar la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora

Este ejemplo demuestra el análisis de muestras que contienen ADN libre de células de un receptor de trasplante para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en las muestras. Se usan los cambios en los niveles de ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo para diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el receptor de trasplante, así como para informar de la necesidad de ajustar o mantener las terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante.

Selección de sujetos

Se selecciona un paciente humano que era el sujeto de un trasplante de riñón 12 meses antes de este ensayo tal como se describe en este ejemplo. El paciente está sometiéndose a tratamiento con terapia inmunosupresora para impedir el rechazo del aoinjerto. Se recogerán muestras de plasma diferenciadas de este sujeto en una base semanal a lo largo del transcurso de tres meses consecutivos, comenzando el mes 12 (el aniversario de un año) después del evento de trasplante. Por consiguiente, el receptor de trasplante se analizará durante los meses 12, 13 y 14 después del evento de trasplante. Los métodos descritos en este ejemplo son aplicables a una o más de las muestras aisladas del receptor de trasplante.

Recogida de plasma

Se extrae sangre del sujeto de modo que puede extraerse ADN libre de células del plasma aislado a partir de esta muestra de sangre. Se recoge la muestra de sangre en un tubo de recogida de sangre con ADN libre de células (Streck) según el método de punción venosa tal como se describió anteriormente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). El tubo Streck se llena completamente con la muestra de sangre. Se retira el tubo del adaptador y se mezcla inmediatamente mediante inversión suave de aproximadamente 8 a 10 veces. Tras la recogida, se transportan los tubos y se almacenan dentro del intervalo de temperatura de 6-37°C durante hasta 14 días. Tras el procesamiento de la muestra, se centrifuga el tubo Streck que contiene la muestra de sangre a 1600 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retira cuidadosamente la capa de plasma resultante y se transfiere a un tubo de 15 ml. Se centrifuga entonces esta muestra de plasma a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retira cuidadosamente la capa de plasma resultante y se coloca dentro de un tubo nuevo, y entonces puede procederse a la extracción de ADN libre de células (ADNlc) de la muestra de plasma. También pueden usarse tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson) y métodos de vertido de CPT durante la recogida de plasma.

Extracción de ADN libre de células (ADNlc)

Se usan aproximadamente 5 ml de plasma de la muestra de plasma para proceder a la extracción de ADN libre de células. Para tubos de recogida de sangre con ADN libre de células (Streck), puede usarse la página 26 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 4 de la página 28, el periodo de incubación es de 1 hora a 60°C, y en la etapa 15 de la página 29, eluir con 30 µl de tampón AVE. Para tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson), puede usarse la página 22 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 15 de la página 25, eluir con 21 µl de tampón AVE. También puede usarse el método QIASymphony para extraer ADNlc. Otros métodos de extracción de ADN pueden incluir también métodos de extracción a base de fenol/cloroformo.

Selección de SNP

Tras la extracción de ADN libre de células de la muestra de plasma del sujeto, pueden someterse a ensayo diversos SNP en el ADN libre de células. Se seleccionan una variedad de SNP para el análisis. Pueden seleccionarse SNP basándose en los que pueden proporcionar las mayores frecuencias de alelo minoritario posibles (las más próximas al 50%). La ubicación de los SNP en el genoma del sujeto puede variar; puede permitirse la unión genética, pero algo de separación genética de los SNP tal como, por ejemplo, separación de >200 pb puede ser también deseable. El número y la identidad de los SNP que van a usarse deben proporcionar suficiente potencia como para estimar de manera exacta el porcentaje de ADNlc derivado del donante presente en la muestra de plasma del sujeto. Los SNP

que van a usarse en este ensayo incluyen los identificados anteriormente (Pakstis *et al.*, 2010). Para amplificar los SNP, se diseñan 92 pares de cebadores (Fluidigm).

5 *Materiales para la amplificación de ADN*

Para amplificar regiones seleccionadas como diana que incluyen SNP de interés en el ADN libre de células, se ensamblan diversos materiales que se usarán en el proceso de amplificación. Se usará el sistema de PCR de alta fidelidad FastStart (Roche). Se diseñan 92 pares de cebadores y se producen (IDT o Fluidigm según diseño de Fluidigm). Se usarán Exol y tampón Exol (New England BioLabs). Los métodos que se siguen incluyen el protocolo de amplificación previa de Fluidigm (Véase la página 152 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los instrumentos que se usarán incluyen una máquina de PCR, una centrifuga de placas y un agitador de vórtex.

15 *Amplificación de ADN*

El ADN libre de células se amplifica según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 63 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales que van a usarse para este protocolo de amplificación incluyen un Access Array de Fluidigm, o chip, sistema de PCR de alta fidelidad FastStart (Roche), disolución de cosecha de Access Array 1X (Fluidigm, PN 100-1031), reactivo de carga de Access Array 20X (Fluidigm) y los 92 pares de cebadores diseñados tal como se describió anteriormente. Los instrumentos que van a usarse para este protocolo de amplificación incluyen dos controladores IFC AX (Fluidigm) y un ciclador FC1 (Fluidigm).

20 *Marcaje con código de barras*

Tras amplificarse el ADN libre de células, se marca el ADN amplificado con código de barras. El marcaje con código de barras puede hacerse, por ejemplo, para identificar de manera única en cuál de las tres muestras se detectaba cualquier ADN amplificado originado a partir de si moléculas ADN libre de células de todas las muestras van a secuenciarse juntas. El ADN libre de células amplificado se codifica con código de barras según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 70 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales que van a usarse para este protocolo de marcaje con código de barras incluyen un sistema de PCR de alta fidelidad FastStart (Roche) y una biblioteca de códigos de barras de Access Array para secuenciadores de Illumina (Fluidigm). Los instrumentos que se usarán incluyen una máquina de PCR, una centrifuga de placas y un agitador de vórtex.

35 *Secuenciación*

Tras haberse marcado con código de barras el ADN libre de células, se secuencia. El ADN libre de células marcado con código de barras se secuencia según protocolos de secuenciación de Fluidigm/Illumina para secuenciación múltiple (véase la página 134 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales que van a usarse para este protocolo de secuenciación incluyen cebadores de secuenciación FL1 y FL2 (Fluidigm), tampón HT1 (Illumina) y un kit de reactivos MiSeq v2 (Illumina). Los instrumentos que se usarán incluyen un instrumento de secuenciación MiSeq (Illumina).

45 *Análisis de datos*

Tras secuenciarse el ADN libre de células, se analiza para determinar la presencia y/o cantidad de diversos alelos de SNP tal como se describió anteriormente. El análisis primario implica la generación de archivos de salida de FASTQ a partir del instrumento MiSeq. El análisis secundario implica la alineación de las secuencias de salida secuenciadas mediante MiSeq con una secuencia de referencia, que en este caso serán secuencias del genoma humano. Se usa el software de alineación "Bowtie" para realizar la alineación con el genoma completo usando parámetros por defecto. Si se desea, pueden hacerse modificaciones de modo que sólo se alineen los amplicones previstos. También pueden usarse alineadores que reconocen los alelos para lograr una mejor alineación con alelos que no son de referencia (el 50% de las alineaciones). Tras completarse la alineación, se asignan frecuencias de variantes usando el programa de software "LoFreq" (Wilm *et al.*, 2012). El análisis terciario implica aspectos de control de calidad del análisis. Los datos se analizan para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de lecturas para lograr un recuento suficiente. Los datos se analizan también para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de loci de SNP por encima del fondo y por debajo del nivel de determinación heterocigoto. Estos límites inferior (fondo) y superior (loci heterocigotos de receptor de trasplante) pueden variar. Además, puede determinarse el ADN genómico y asignarse un corte.

Los métodos usados en los datos terciarios determinarán los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra dada. El análisis incluirá determinar valores de corte alto y bajo, asignar valores a SNP homocigotos y heterocigotos, multiplicar SNP heterocigotos por 2, calcular la mediana y calcular el intervalo de confianza (IC). Los métodos de análisis adicionales y/o métodos para mejorar la calidad del análisis incluyen determinaciones basadas en probabilidad de la contribución de cada alelo, el uso de ADN de control en cada reacción de secuenciación con niveles de ruido definidos por locus, la asignación del estado homocigoto o heterocigoto basándose en la probabilidad o distribuciones β y la asignación de determinaciones que se ponderan potencialmente para tratar artefactos de

compresión en el extremo bajo. Se indica que cada muestra adicional de un sujeto puede mejorar la confianza en la exactitud de determinación del porcentaje de ADN libre de células derivado del donante.

Determinación del estado del órgano trasplantado

5 Los métodos de análisis de datos descritos anteriormente se usan para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras de ADN libre de células obtenidas del receptor de trasplante. El análisis de datos implica la comparación de los niveles de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las tres muestras para determinar si los niveles de ADN libre de células derivado del donante están aumentando, disminuyendo o están manteniéndose a niveles relativamente constantes en ADN libre de células aislado del receptor de trasplante a lo largo del tiempo. Un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativo de rechazo de trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. Una disminución en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativa de tolerancia al trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. Ningún cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativo de estado de rechazo de trasplante estable y/o una oportunidad de ajuste de la terapia inmunosupresora.

Ejemplo 2-Análisis adicional de ADN libre de células para determinar el estado de un órgano trasplantado en un receptor de trasplante y determinar la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora

20 Este ejemplo demuestra análisis adicionales de muestras que contienen ADN libre de células de un receptor de trasplante para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en las muestras que se acumula tras el análisis descrito en el ejemplo 1. Se usan los cambios en los niveles de ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo para diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el receptor de trasplante, así como para informar de la necesidad de ajustar o mantener las terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante.

Selección de sujetos

30 Se selecciona un paciente humano que era el sujeto de un trasplante de riñón 12 meses antes de este ensayo tal como se describe en este ejemplo. El paciente está sometiéndose a tratamiento con terapia inmunosupresora para impedir el rechazo del aloinjerto. Se recogerán muestras de plasma diferenciadas de este sujeto en una base semanal a lo largo del transcurso de tres meses consecutivos, comenzando el mes 12 (el aniversario de un año) después del evento de trasplante. Por consiguiente, el receptor de trasplante se analizará durante los meses 12, 13 y 14 después del evento de trasplante. Los métodos descritos en este ejemplo son aplicables a una o más de las muestras aisladas del receptor de trasplante.

Recogida de plasma

40 Se extrae sangre del sujeto de modo que puede extraerse ADN libre de células del plasma aislado a partir de esta muestra de sangre. Se recoge la muestra de sangre en un tubo de recogida de sangre con ADN libre de células (ADN libre de células Streck BCT) según el método de punción venosa tal como se describió anteriormente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). El tubo Streck se llena completamente con la muestra de sangre. Se retira el tubo del adaptador y se mezcla inmediatamente mediante inversión suave de aproximadamente 8 a 10 veces. Tras la recogida, se transportan los tubos y se almacenan dentro del intervalo de temperatura de 6-37°C durante hasta 14 días. Tras el procesamiento de la muestra, se centrifuga el tubo Streck que contiene la muestra de sangre a 1600 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retira cuidadosamente la capa de plasma resultante y se transfiere a un tubo de 15 ml. Se centrifuga entonces esta muestra de plasma a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retira el sobrenadante y se coloca dentro de un tubo nuevo y se centrifuga a 16.000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retira cuidadosamente la capa de plasma resultante y se coloca dentro de un tubo nuevo, y puede procederse entonces a la extracción de ADN libre de células (ADNlc) de la muestra de plasma. También pueden usarse tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson) y métodos de vertido de CPT durante la recogida de plasma.

Extracción de ADN libre de células (ADNlc)

55 Se usan aproximadamente 5 ml de plasma de la muestra de plasma para proceder con la extracción de ADN libre de células. Para tubos de recogida de sangre con ADN libre de células (Streck), puede usarse la página 26 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 4 de la página 28, el periodo de incubación es de 1 hora a 60°C, y en la etapa 15 de la página 29, eluir con 30 µl de tampón AVE. Para tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson), puede usarse la página 22 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 15 de la página 25, eluir con 21 µl de tampón AVE. También pueden usarse los métodos QIASymphony para extraer ADNlc. Otros métodos de extracción de ADN pueden incluir también métodos de extracción a base de fenol/cloroformo.

Selección de SNP

Tras la extracción de ADN libre de células de la muestra de plasma del sujeto, pueden someterse a ensayo diversos SNP en el ADN libre de células. Se seleccionan una variedad de SNP para el análisis. Pueden seleccionarse SNP basándose en los que pueden proporcionar las mayores frecuencias de alelo minoritario posibles (las más próximas al 50%). La ubicación de los SNP en el genoma del sujeto puede variar; puede permitirse la unión genética, pero algo de separación genética de los SNP tal como, por ejemplo, separación de >200 pb puede ser también deseable. El número y la identidad de los SNP que van a usarse debe proporcionar suficiente potencia como para estimar de manera exacta el porcentaje de ADNlc derivado del donante presente en la muestra de plasma del sujeto. Los SNP que van a usarse en este ensayo incluyen los identificados anteriormente (Pakstis *et al.*, 2010), así como otros seleccionados para cumplir la frecuencia de alelo minoritario mayor de 0,4, una tasa baja establecida de error de ADN polimerasa y baja unión. Para amplificar los SNP, se diseñan 266 pares de cebadores (Fluidigm).

Amplificación previa de ADN

Para amplificar regiones seleccionadas como diana que incluyen SNP de interés en el ADN libre de células, se ensamblan diversos materiales que se usarán en el proceso de amplificación. Se usará una polimerasa de alta fidelidad tal como FastStart High Fidelity (Roche), Expand High Fidelity (Roche), Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific), KAPA HiFi (Kapa BioSystems) o KAPA2G (Kapa Biosystems). Se diseñan 266 pares de cebadores y se producen (IDT o Fluidigm según diseño de Fluidigm). Se usarán Exol y tampón Exol (New England Biolabs). Los métodos de seguimiento incluyen el protocolo de amplificación previa de Fluidigm (véase la página 152 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los instrumentos que se usarán incluyen una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Amplificación de ADN

El ADN libre de células se amplifica según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 63 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales que van a usarse para este protocolo de amplificación incluyen un Access Array de Fluidigm, o chip, una polimerasa de alta fidelidad tal como FastStart High Fidelity (Roche), Expand High Fidelity (Roche), Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific), KAPA HiFi (Kapa BioSystems) o KAPA2G (Kapa Biosystems), disolución de cosecha de Access Array 1X (Fluidigm, PN 100-1031), reactivo de carga de Access Array 20X (Fluidigm) y los 226 pares de cebadores diseñados tal como se describió anteriormente. Los instrumentos que van a usarse para este protocolo de amplificación incluyen dos controladores IFC AX (Fluidigm) y un ciclador FC1 (Fluidigm).

Indexación (también conocido como marcaje con código de barras)

Tras amplificarse el ADN libre de células, el ADN amplificado se indexa usando secuencias de índice, también denominadas códigos de barras o etiquetas. La indexación puede hacerse, por ejemplo, para identificar de manera única en cuál de las tres muestras se detectaba cualquier ADN amplificado originado a partir de si moléculas ADN libre de células de todas las muestras van a secuenciarse juntas. El ADN libre de células amplificado se indexa según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 70 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales que van a usarse para este protocolo de indexación incluyen una polimerasa de alta fidelidad tal como FastStart High Fidelity (Roche), Expand High Fidelity (Roche), Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific), KAPA HiFi (Kapa BioSystems) o KAPA2G (Kapa Biosystems), y una biblioteca de códigos de barras de Access Array para secuenciadores de Illumina (Fluidigm, también denominada biblioteca de índices). Los instrumentos que se usarán incluyen una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Secuenciación

Tras haberse amplificado e indexado el ADN libre de células, se secuencia. El ADN libre de células indexado se secuencia según protocolos de secuenciación de Fluidigm/Illumina para secuenciación múltiple (véase la página 134 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales que van a usarse para este protocolo de secuenciación incluyen cebadores de secuenciación FL1 y FL2 (Fluidigm), tampón HT1 (Illumina) y un kit de reactivos MiSeq v3 (Illumina). Los instrumentos que se usarán incluyen un instrumento de secuenciación MiSeq (Illumina).

Análisis de datos

Tras secuenciarse el ADN libre de células, se analiza para determinar la presencia y/o cantidad de diversos alelos de SNP tal como se describió anteriormente (véase por ejemplo la figura 7). El análisis primario implica la generación de archivos de salida de FASTQ a partir del instrumento MiSeq. El análisis secundario implica la alineación de las secuencias de salida secuenciadas mediante MiSeq con una secuencia de referencia, que en este caso serán secuencias del genoma humano. El recorte de extremos se produce usando los paquetes de software "Cutadapt" y "TrimGalore". Se usa el software de alineación "BWA" para realizar la alineación con las regiones genómicas que

abarcan el conjunto de amplicones amplificados. También pueden usarse alineadores que reconocen los alelos para lograr una mejor alineación con alelos que no son de referencia (el 50% de las alineaciones). Tras completarse la alineación, se asignan frecuencias de variantes usando el programa de software "SAMtools" y parámetros adaptados para minimizar la inclusión de errores de secuenciación. El análisis terciario implica aspectos de control de calidad del análisis. Los datos se analizan para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de lecturas para lograr un recuento suficiente para cada posición de SNP y garantizar que no hay alelos adicionales presentes en el receptor. Los datos se analizan también para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo y máximo de loci de SNP por encima del fondo y por debajo del nivel de determinación heterocigoto. Estos límites inferior (fondo) y superior (loci heterocigotos de receptor de trasplante) pueden variar. Además, hay métricas para garantizar ADN de entrada suficiente para lograr una medición exacta determinando la calidad de los datos de SNP heterocigotos. Además, puede determinarse el ADN genómico y asignarse un corte.

Los métodos usados en los datos terciarios determinarán los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra dada. El análisis incluye determinar el conjunto de SNP que son homocigotos en el receptor, determinar valores de corte bajo y alto para la frecuencia de alelos de los SNP homocigotos del receptor para su uso en la estimación del porcentaje de ADN libre de células derivado del donante, calcular la media de los SNP homocigotos del receptor restantes y evaluar un multiplicador basado en la relación entre el donante y el receptor, y calcular el intervalo de confianza (CI). Métodos de análisis adicionales y/o métodos para mejorar la calidad del análisis incluyen estimaciones basadas en probabilidad o métodos bayesianos de las distribuciones de alelos del donante o receptor para cada SNP o del porcentaje de ADN libre de células derivado del donante, y el de ADN de control en cada reacción de secuenciación con niveles de ruido definidos por locus. Se indica que cada muestra adicional de un sujeto puede mejorar la confianza en la exactitud de la determinación del porcentaje de ADN libre de células derivado del donante.

Determinación del estado del órgano trasplantado

Los métodos de análisis de datos descritos anteriormente se usan para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras de ADN libre de células obtenidas del receptor de trasplante. El análisis de datos implica la comparación de los niveles de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las tres muestras para determinar si los niveles de ADN libre de células derivado del donante están aumentando, disminuyendo o están manteniéndose a niveles relativamente constantes en ADN libre de células aislado del receptor de trasplante a lo largo del tiempo. Un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativo de rechazo de trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. Una disminución en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativa de tolerancia al trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado. Ningún cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativo de estado de rechazo de trasplante estable y/o una oportunidad de ajuste de la terapia inmunosupresora.

Ejemplo 3-Análisis de ADN libre de células para determinar el estado de un órgano trasplantado en un receptor de trasplante de corazón y predecir la necesidad de ajustar la terapia inmunosupresora

Este ejemplo demuestra el análisis de muestras que contienen ADN libre de células de un conjunto de 18 receptores de trasplantes para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en las muestras. Se usan los cambios en los niveles de ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo para diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el receptor de trasplante y predecir el estado futuro del órgano trasplantado, así como para informar de la necesidad de ajustar o mantener las terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante.

Selección de sujetos

Se seleccionaron pacientes humanos que eran el sujeto de un trasplante de corazón antes de este ensayo tal como se describe en este ejemplo. Los pacientes estaban sometiéndose a tratamiento con terapia inmunosupresora para impedir el rechazo del aloinjerto. Se recogieron muestras de plasma diferenciadas de estos sujetos en las visitas dictadas por la norma asistencial en sus respectivos centros a lo largo del transcurso de cinco meses consecutivos. Los métodos descritos en este ejemplo son aplicables a una o más de las muestras aisladas del receptor de trasplante.

Recogida de plasma

Se extrajo sangre de los sujetos de modo que pudo extraerse ADN libre de células del plasma aislado de la muestra de sangre. Se recogió la muestra de sangre en tubos de PPT según el método de punción venosa tal como se describió anteriormente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). El tubo de PPT (tubo de preparación de plasma, Becton Dickinson) se llenó completamente con la muestra de sangre. Se retiró el tubo del adaptador y se mezcló inmediatamente mediante inversión suave. Tras la recogida, se centrifugaron los tubos según el protocolo del fabricante y se almacenaron a -80°C. Tras el procesamiento de la muestra, se descongeló el tubo y se retiró cuidadosamente la capa de plasma y se transfirió a un tubo limpio. La muestra de plasma se centrifugó entonces a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se colocó dentro de un tubo nuevo

y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró cuidadosamente la capa de plasma resultante y se colocó dentro de un tubo nuevo en preparación para extraer ADN libre de células (ADNlc).

Extracción de ADN libre de células (ADNlc)

Se usó aproximadamente 1 ml de plasma de la muestra de plasma para proceder a la extracción de ADN libre de células. Para tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson), se usó la página 22 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 15 de la página 25, eluir con 21 µl de tampón AVE.

Selección de SNP

Se seleccionaron diversos SNP para su análisis para estimar el porcentaje de ADNlc derivado del donante presente en la muestra de plasma del sujeto. Los SNP seleccionados para el análisis fueron rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. Para amplificar los SNP, se diseñaron 266 pares de cebadores (Fluidigm).

Amplificación previa de ADN

Para amplificar regiones seleccionadas como diana que incluyen SNP de interés en el ADN libre de células, se ensamblaron diversos materiales y se usaron en el proceso de amplificación. Se usó la ADN polimerasa Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific). Se diseñaron 266 pares de cebadores y se produjeron (IDT o Fluidigm según diseño de Fluidigm). Se usaron Exol y tampón Exol (New England BioLabs). Los métodos seguidos incluían el protocolo de amplificación previa de Fluidigm (véase la página 152 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrifuga de placas y un agitador de vórtex.

Amplificación de ADN

Se amplificó el ADN libre de células de la amplificación previa según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 63 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de amplificación incluían un Access Array de Fluidigm, o chip, la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), disolución de cosecha de Access Array 1X (Fluidigm, PN 100-1031), reactivo de carga de Access Array 20X (Fluidigm) y los 266 pares de cebadores diseñados tal como se describió anteriormente. Los instrumentos usados para este protocolo de amplificación incluían dos controladores IFC AX (Fluidigm) y un ciclador FC1 (Fluidigm).

Indexación (también conocido como marcaje con código de barras)

Tras amplificarse el ADN libre de células, se indexó el ADN amplificado usando secuencias de índice, también denominadas códigos de barras o etiquetas. La indexación puede hacerse, por ejemplo, para identificar de manera

única en cuál de las tres muestras se detectaba cualquier ADN amplificado originado a partir de si moléculas ADN libre de células de todas las muestras van a secuenciarse juntas. El ADN libre de células amplificado se indexó según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 70 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de indexación incluían la polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific) y una biblioteca de códigos de barras de Access Array para secuenciadores de Illumina (Fluidigm, también denominada biblioteca de índices). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Secuenciación

Tras amplificarse e indexarse el ADN libre de células, se secuenció. Se secuenció el ADN libre de células indexado según protocolos de secuenciación de Fluidigm/Illumina para secuenciación múltiple (véase la página 134 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de secuenciación incluían cebadores de secuenciación FL1 y FL2 (Fluidigm), tampón HT1 (Illumina) y un kit de reactivos MiSeq v3 (Illumina). Se secuenció el ADN libre de células usando un instrumento de secuenciación MiSeq (Illumina).

Análisis de datos

Tras secuenciarse el ADN libre de células, se analizó para determinar la presencia y/o cantidad de diversos alelos de SNP (Véase la figura 7 para un esquema general). El análisis primario implicaba la generación de archivos de salida de FASTQ a partir del instrumento MiSeq. El análisis secundario implicaba la alineación de las secuencias de salida secuenciadas mediante MiSeq con la secuencia del genoma humano de referencia. Se realizó el recorte de extremos usando los paquetes de software "Cutadapt" y "Trim-Galore". Se usó el software de alineación "BWA" para realizar la alineación con las regiones genómicas que abarcan el conjunto de amplicones amplificados. Tras completarse la alineación, se asignaron frecuencias de variantes usando el programa de software "SAMtools" y parámetros adaptados para minimizar la inclusión de errores de secuenciación.

El análisis terciario de este tipo de datos implica generalmente aspectos de control de calidad del análisis. Los datos se analizan para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de lecturas para lograr un recuento suficiente para cada posición de SNP y garantizar que no hay alelos adicionales presentes en el receptor. Los datos se analizan también para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo y máximo de loci de SNP por encima del fondo y por debajo del nivel de determinación heterocigoto. Estos límites inferior (fondo) y superior (loci heterocigotos de receptor de trasplante) pueden variar. Además, hay métricas para garantizar ADN de entrada suficiente para lograr una medición exacta determinando la calidad de los datos de SNP heterocigotos. Además, puede determinarse el ADN genómico y asignarse un corte.

Los métodos usados en los datos terciarios determinaron los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra dada. El análisis incluía ajustar la frecuencia de alelo minoritario de los SNP para errores de secuenciación o amplificación restando una tasa de error determinada empíricamente para cada transición o transversión, determinar el conjunto de SNP que tienen una frecuencia de alelo minoritario menor que un corte entre 0,1 y 0,25 como homocigoto en el receptor, luego usar el nivel del alelo minoritario en estos SNP para el cálculo de la contribución del donante como porcentaje del ADN libre de células total. Se eliminaron SNP con valores menores de una frecuencia de alelo minoritario de 0,0008. La mediana del 55,4% inferior de los SNP restantes se dobló y se calculó el promedio con la mediana del 44,6% superior de los SNP para estimar la contribución del donante.

Determinación del estado del órgano trasplantado

Los métodos de análisis de datos descritos anteriormente se usaron para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en cada de las muestras de ADN libre de células obtenidas de los receptores de trasplantes. El análisis de datos implicaba la comparación de los niveles de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras con las otras muestras de ese paciente para determinar si los niveles de ADN libre de células derivado del donante estaban aumentando, disminuyendo o estaban manteniéndose a niveles relativamente constantes en ADN libre de células aislado del receptor de trasplante a lo largo del tiempo. Un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativo de rechazo de trasplante tal como se muestra en la figura 1 y la figura 2. La figura 1 muestra la relación entre rechazo bien caracterizado y alto porcentaje de ADN libre de células derivado del donante. La figura 2 muestra la capacidad de ADN libre de células elevado para predecir rechazo inminente en el plazo de aproximadamente un mes. Esto sugiere que el médico puede necesitar ajustar la terapia inmunosupresora, y/o investigar adicionalmente el estado del órgano trasplantado.

Ejemplo 4-Análisis de ADN libre de células para determinar el estado de un órgano trasplantado en un receptor de trasplante, ajustar la terapia inmunosupresora y monitorizar el tratamiento

Este ejemplo demuestra el análisis de muestras que contienen ADN libre de células de un receptor de trasplante de corazón y la determinación del nivel de ADN libre de células derivado del donante en las muestras. Los niveles del ADN libre de células derivado del donante se usan para diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el receptor de trasplante, así como para informar de la necesidad de ajustar o mantener las terapias inmunosupresoras que se

administran al receptor de trasplante. Posteriormente pueden usarse los cambios en curso de los niveles de ADN libre de células derivado del donante para monitorizar el éxito de los cambios en la terapia inmunosupresora.

Selección de sujetos

5 Se seleccionó un paciente humano que era el sujeto de un trasplante de corazón antes de este ensayo tal como se describe en este ejemplo. El paciente estaba sometiéndose a tratamiento con terapia inmunosupresora para impedir el rechazo del aloinjerto. Se recogieron muestras de plasma diferenciadas en visitas regulares según la norma asistencial en el plazo de los tres meses tras el rechazo. Por consiguiente, el receptor de trasplante se analizó durante 10 las semanas siguientes a un evento de rechazo. Los métodos descritos en este ejemplo son aplicables a una o más de las muestras aisladas del receptor de trasplante.

Recogida de plasma

15 Se extrajo sangre del sujeto de modo que pudo extraerse ADN libre de células del plasma aislado de la muestra de sangre. Se recogió la muestra de sangre en tubos de PPT según el método de punción venosa tal como se describió anteriormente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). El tubo de PPT (tubo de preparación de plasma, Becton Dickinson) se llenó completamente con la muestra de sangre. Se retiró el tubo del adaptador y se mezcló inmediatamente mediante inversión suave. Tras la recogida, se centrifugaron los tubos según el protocolo del fabricante y se almacenaron a -80°C. Tras el procesamiento de la muestra, se descongeló el tubo y se retiró cuidadosamente la capa de plasma y se transfirió a un tubo limpio. Esta muestra de plasma se centrifugó entonces a 20 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se colocó dentro de un tubo nuevo y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró cuidadosamente la capa de plasma resultante y se colocó dentro de un tubo nuevo, y se procedió a la extracción de ADN libre de células (ADNlc) de la muestra de plasma. 25

Extracción de ADN libre de células (ADNlc)

30 Se usó aproximadamente 1 ml de plasma de la muestra de plasma para proceder a la extracción de ADN libre de células. Para tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson), se usó la página 22 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 15 de la página 25, eluir con 21 µl de tampón AVE.

Selección de SNP

35 Se seleccionaron diversos SNP para su análisis para estimar el porcentaje de ADNlc derivado del donante presente en la muestra de plasma del sujeto. Los SNP seleccionados para el análisis fueron rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, 40 rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, 45 rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, 50 rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, 55 rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, 60 rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. Para amplificar los SNP, se diseñaron 266 pares de cebadores (Fluidigm). 65

Amplificación previa de ADN

Para amplificar regiones seleccionadas como diana que incluyen SNP de interés en el ADN libre de células, se ensamblaron diversos materiales y se usaron en el proceso de amplificación. Se usó la ADN polimerasa Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific). Se diseñaron 266 pares de cebadores y se produjeron (IDT o Fluidigm según el diseño de Fluidigm). Se usaron Exol y tampón Exol (New England BioLabs). Los métodos seguidos incluían el protocolo de amplificación previa de Fluidigm (véase la página 152 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Amplificación de ADN

Se amplificó el ADN libre de células de la amplificación previa según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 63 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de amplificación incluían un Access Array de Fluidigm, o chip, la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), disolución de cosecha de Access Array 1X (Fluidigm, PN 100-1031), reactivo de carga de Access Array 20X (Fluidigm) y los 266 pares de cebadores diseñados tal como se describió anteriormente. Los instrumentos usados para este protocolo de amplificación incluían dos controladores IFC AX (Fluidigm) y un ciclador FC1 (Fluidigm).

Indexación (también conocido como marcaje con código de barras)

Tras amplificarse el ADN libre de células, se indexó el ADN amplificado usando secuencias de índice, también denominadas códigos de barras o etiquetas. La indexación puede hacerse, por ejemplo, para identificar de manera única en cuál de las tres muestras se detectaba cualquier ADN amplificado originado a partir de si moléculas ADN libre de células de todas las muestras van a secuenciarse juntas. El ADN libre de células amplificado se indexó según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 70 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de indexación incluían la polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific) y una biblioteca de códigos de barras de Access Array para secuenciadores de Illumina (Fluidigm, también denominada biblioteca de índices). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas, y un agitador de vórtex.

Secuenciación

Tras amplificarse e indexarse el ADN libre de células, se secuenció. Se secuenció el ADN libre de células indexado según protocolos de secuenciación de Fluidigm/Illumina para secuenciación múltiple (véase la página 134 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de secuenciación incluían cebadores de secuenciación FL1 y FL2 (Fluidigm), tampón HT1 (Illumina) y un kit de reactivos MiSeq v3 (Illumina). Se secuenció ADN libre de células usando un instrumento de secuenciación MiSeq (Illumina).

Análisis de datos

Tras secuenciarse el ADN libre de células, se analizó para determinar la presencia y/o cantidad de diversos alelos de SNP (véase la figura 7 para un esquema general). El análisis primario implicaba la generación de archivos de salida de FASTQ a partir del instrumento MiSeq. El análisis secundario implicaba la alineación de las secuencias de salida secuenciadas mediante MiSeq con la secuencia del genoma humano de referencia. Se realizó el recorte de extremos usando los paquetes de software "Cutadapt" y "Trim-Galore". Se usó el software de alineación "BWA" para realizar la alineación con las regiones genómicas que abarcan el conjunto de amplicones amplificados. Tras completarse la alineación, se asignaron frecuencias de variantes usando el programa de software "SAMtools" y parámetros adaptados para minimizar la inclusión de errores de secuenciación.

El análisis terciario de este tipo de datos implica generalmente aspectos de control de calidad del análisis. Los datos se analizan para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de lecturas para lograr un recuento suficiente para cada posición de SNP y garantizar que no hay alelos adicionales presentes en el receptor. Los datos se analizan también para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo y máximo de loci de SNP por encima del fondo y por debajo del nivel de determinación heterocigoto. Estos límites inferior (fondo) y superior (loci heterocigotos de receptor de trasplante) pueden variar. Además, hay métricas para garantizar ADN de entrada suficiente para lograr una medición exacta determinando la calidad de los datos de SNP heterocigotos. Además, puede determinarse el ADN genómico y asignarse un corte.

Los métodos usados en los datos terciarios determinaron los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra dada. El análisis incluía ajustar la frecuencia de alelo minoritario de los SNP para errores de secuenciación o amplificación restando una tasa de error determinada empíricamente para cada transición o transversión, determinar el conjunto de SNP que tienen una frecuencia de alelo minoritario menor que un corte entre 0,1 y 0,25 como homocigoto en el receptor, luego usar el nivel del alelo minoritario en estos SNP para el cálculo de la contribución del donante como porcentaje del ADN libre de células total. Se eliminaron SNP con valores menores de

una frecuencia de alelo minoritario de 0,0008. La mediana del 55,4% inferior de los SNP restantes se dobló y se calculó el promedio con la mediana del 44,6% superior de los SNP para estimar la contribución del donante.

Determinación del estado del órgano trasplantado

5 Los métodos de análisis de datos descritos anteriormente se usaron para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras de ADN libre de células obtenidas del receptor de trasplante. El análisis de datos implicaba la comparación de los niveles de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras con las otras muestras de ese paciente para determinar si los niveles de ADN libre de células derivado del donante estaban aumentando, disminuyendo o estaban manteniéndose a niveles relativamente constantes en ADN libre de células aislado del receptor de trasplante a lo largo del tiempo. La figura 1 muestra la relación entre rechazo bien caracterizado y alto porcentaje de ADN libre de células derivado del donante. En este ejemplo, tal como se muestra en la figura 3, el paciente había experimentado rechazo (tal como se determinó mediante biopsia endomiocárdica) y también tenía altos niveles de ADN_{ic}-dd (>5%). Al paciente se le administró un tratamiento inmunosupresor con esteroides en bolo. Muestras posteriores tomadas a los 20 y 51 días tras el tratamiento demuestran que puede monitorizarse el tratamiento inmunosupresor satisfactorio mediante el examen de los niveles de ADN_{ic}-dd que retornan a niveles que indican ausencia de rechazo (figura 3).

20 Ejemplo 5-Análisis de ADN libre de células para determinar el estado del trasplante de riñón en un receptor de trasplante, ajustar la terapia inmunosupresora y monitorizar el tratamiento

25 Este ejemplo demuestra el análisis de muestras que contienen ADN libre de células de un receptor de trasplante de riñón para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en las muestras. Se usaron los cambios en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo para diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el receptor de trasplante, así como para informar de la necesidad de ajustar o mantener las terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante.

Selección de sujetos

30 Se seleccionó un paciente humano que era el sujeto de un trasplante de riñón 8 días antes de este ensayo tal como se describe en este ejemplo. El paciente estaba sometiéndose a tratamiento con terapia inmunosupresora para impedir el rechazo del aloinjerto. Se recogieron muestras de plasma diferenciadas de este sujeto durante tres meses consecutivos, comenzando en el primer evento de rechazo 8 días tras el trasplante. Por consiguiente, el receptor de trasplante se analizó durante las semanas siguientes a un evento de rechazo. Los métodos descritos en este ejemplo son aplicables a una o más de las muestras aisladas del receptor de trasplante.

Recogida de plasma

40 Se extrajo sangre del sujeto de modo que pudo extraerse ADN libre de células del plasma aislado de la muestra de sangre. Se recogió la muestra de sangre en tubos de CPT según el método de punción venosa tal como se describió anteriormente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). El tubo de CPT (Becton Dickinson) se llenó completamente con la muestra de sangre. Se retiró el tubo del adaptador y se mezcló inmediatamente mediante inversión suave. Tras la recogida, se centrifugaron los tubos según el protocolo del fabricante y se vertió la fracción de plasma y células mononucleares dentro de un tubo que contenía 5 ml de PBS. Se centrifugó este segundo tubo para sedimentar las células y se retuvo el sobrenadante de plasma y se almacenó a -80°C. Tras el procesamiento de la muestra, se descongeló el tubo y la muestra de plasma se centrifugó entonces a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se colocó dentro de un tubo nuevo y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró cuidadosamente la capa de plasma resultante y se colocó dentro de un tubo nuevo, y entonces se procedió a la extracción de ADN libre de células (ADN_{ic}) de la muestra de plasma.

Extracción de ADN libre de células (ADN_{ic})

55 Se usaron aproximadamente 1-2 ml de plasma de la muestra de plasma para proceder a la extracción de ADN libre de células. Para tubos de recogida de sangre con ADN libre de células (Streck), se usó la página 26 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 4 de la página 28, el periodo de incubación es de 1 hora a 60°C, y en la etapa 15 de la página 29, eluir con 30 µl de tampón AVE. Para tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson), se usó la página 22 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 15 de la página 25, eluir con 21 µl de tampón AVE.

Selección de SNP

65 Se seleccionaron diversos SNP para su análisis para estimar el porcentaje de ADN_{ic} derivado del donante presente en la muestra de plasma del sujeto. Los SNP seleccionados para el análisis fueron rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806,

rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2450230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. Para amplificar los SNP, se diseñaron 266 pares de cebadores (Fluidigm).

Amplificación previa de ADN

Para amplificar regiones seleccionadas como diana que incluyen SNP de interés en el ADN libre de células, se ensamblaron diversos materiales y se usaron en el proceso de amplificación. Se usó la ADN polimerasa de alta fidelidad FastStart High Fidelity (Roche). Se diseñaron 266 pares de cebadores y se produjeron (IDT o Fluidigm según el diseño de Fluidigm). Se usaron Exol y tampón Exol (New England Biolabs). Los métodos seguidos incluían el protocolo de amplificación previa de Fluidigm (véase la página 152 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Amplificación de ADN

Se amplificó el ADN libre de células de la amplificación previa según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 63 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de amplificación incluían un Access Array de Fluidigm, o chip, la ADN polimerasa de alta fidelidad FastStart High Fidelity (Roche), disolución de cosecha de Access Array 1X (Fluidigm, PN 100-1031), reactivo de carga de Access Array 20X (Fluidigm) y los 266 pares de cebadores diseñados tal como se describió anteriormente. Los instrumentos usados para este protocolo de amplificación incluían dos controladores IFC AX (Fluidigm) y un ciclador FC1 (Fluidigm).

Indexación (también conocido como marcaje con código de barras)

Tras amplificarse el ADN libre de células, se indexó el ADN amplificado usando secuencias de índice, también denominadas códigos de barras o etiquetas. La indexación puede hacerse, por ejemplo, para identificar de manera única en cuál de las tres muestras se detectaba cualquier ADN amplificado originado a partir de si moléculas ADN libre de células de todas las muestras van a secuenciarse juntas. El ADN libre de células amplificado se indexó según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 70 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de indexación incluían la ADN polimerasa de alta fidelidad Fast-Start High Fidelity (Roche) y una biblioteca de códigos de barras de Access Array para secuenciadores de Illumina (Fluidigm, también denominada biblioteca de índices). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Secuenciación

Tras amplificarse e indexarse el ADN libre de células, se secuenció. Se secuenció el ADN libre de células indexado según protocolos de secuenciación de Fluidigm/Illumina para secuenciación múltiple (véase la página 134 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de secuenciación incluían cebadores de secuenciación FL1 y FL2 (Fluidigm), tampón HT1 (Illumina) y un kit de reactivos MiSeq v3 (Illumina). Se secuenció el ADN libre de células usando un instrumento de secuenciación MiSeq (Illumina).

Análisis de datos

Tras secuenciarse el ADN libre de células, se analizó para determinar la presencia y/o cantidad de diversos alelos de SNP (véase la figura 7 para un esquema general). El análisis primario implicaba la generación de archivos de salida de FASTQ a partir del instrumento MiSeq. El análisis secundario implicaba la alineación de las secuencias de salida secuenciadas mediante MiSeq con la secuencia del genoma humano de referencia. Se realizó el recorte de extremos usando los paquetes de software "Cutadapt" y "Trim-Galore". Se usó el software de alineación "BWA" para realizar la alineación con las regiones genómicas que abarcan el conjunto de amplicones amplificados. Tras completarse la alineación, se asignaron frecuencias de variantes usando el programa de software "SAMtools" y parámetros adaptados para minimizar la inclusión de errores de secuenciación.

El análisis terciario de este tipo de datos implica generalmente aspectos de control de calidad del análisis. Los datos se analizan para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de lecturas para lograr un recuento suficiente para cada posición de SNP y garantizar que no hay alelos adicionales presentes en el receptor. Los datos se analizan también para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo y máximo de loci de SNP por encima del fondo y por debajo del nivel de determinación heterocigoto. Estos límites inferior (fondo) y superior (loci heterocigotos de receptor de trasplante) pueden variar. Además, hay métricas para garantizar ADN de entrada suficiente para lograr una medición exacta determinando la calidad de los datos de SNP heterocigotos. Además, puede determinarse el ADN genómico y asignarse un corte.

Los métodos usados en los datos terciarios determinaron los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra dada. El análisis incluía ajustar la frecuencia de alelo minoritario de los SNP para errores de secuenciación o amplificación restando una tasa de error determinada empíricamente para cada transición o transversión, determinar el conjunto de SNP que tienen una frecuencia de alelo minoritario menor que un corte entre 0,1 y 0,25 como homocigoto en el receptor, luego usar el nivel del alelo minoritario para el cálculo de la contribución del donante como porcentaje del alelo mayoritario. Se eliminaron los valores más altos del 5% y los más bajos del 5% y se calculó la media de los valores de alelo minoritario de SNP restantes. Este valor estima el nivel heterocigoto para la contribución del donante, por tanto se multiplica por dos para determinar la estimación final de la contribución del donante.

Determinación del estado del órgano trasplantado

Los métodos de análisis de datos descritos anteriormente se usaron para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras de ADN libre de células obtenidas del receptor de trasplante. El análisis de datos implicaba la comparación de los niveles de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras con las otras muestras de ese paciente para determinar si los niveles de ADN libre de células derivado del donante estaban aumentando, disminuyendo o estaban manteniéndose a niveles relativamente constantes en ADN libre de células aislado del receptor de trasplante a lo largo del tiempo. La figura 1 muestra la relación entre rechazo bien caracterizado y alto porcentaje de ADN libre de células derivado del donante. En este ejemplo, tal como se muestra en la figura 4, el receptor de trasplante de riñón experimentó rechazo (tal como se determinó mediante biopsia renal) y también tenía altos niveles de ADNlc-dd (>8%). Se trató al paciente mediante ajuste de la terapia inmunosupresora. Muestras posteriores tomadas a los 40 y 69 días tras el tratamiento demuestran que puede monitorizarse el tratamiento inmunosupresor satisfactorio mediante examen de los niveles de ADNlc-dd que retornan a niveles que indican ausencia de rechazo (menos del 1% de ADNlc-dd, figura 4).

Ejemplo 6-Análisis en serie de ADN libre de células para monitorizar el estado del órgano trasplantado en un receptor de trasplante

Este ejemplo demuestra el análisis de muestras que contienen ADN libre de células de receptores de trasplantes de corazón para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en las muestras. Se usaron los cambios en los niveles de ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo para diagnosticar el estado del órgano trasplantado en un receptor de trasplante, así como para informar de la necesidad de ajustar o mantener las terapias inmunosupresoras que se administran a un receptor de trasplante.

Selección de sujetos

Se seleccionaron pacientes humanos que eran el sujeto de un trasplante de corazón antes de este ensayo tal como se describe en este ejemplo. Los pacientes estaban sometiéndose a tratamiento con terapia inmunosupresora para impedir el rechazo del aloinjerto, pero la información de tratamiento específico se cegó en el momento de las pruebas. Los criterios de selección de pacientes requerían que fueran pacientes estables sin signos de rechazo u otros problemas referentes al estado del órgano trasplantado. Se recogieron muestras de plasma diferenciadas de estos sujetos durante las visitas clínicas según la norma asistencial prescrita por el médico. Los métodos descritos en este ejemplo son aplicables a una o más de las muestras aisladas del receptor de trasplante.

Recogida de plasma

Se extrajo sangre de los sujetos de modo que pudo extraerse ADN libre de células del plasma aislado de la muestra de sangre. Se recogió la muestra de sangre en un tubo de recogida de sangre con ADN libre de células (ADN libre de células Streck BCT) según el método de punción venosa tal como se describió anteriormente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Se llenó el tubo Streck completamente con la muestra de sangre. Se retiró el tubo del adaptador y se mezcló inmediatamente mediante inversión suave de aproximadamente 8 a 10 veces. Tras la recogida, se transportaron los tubos y se almacenaron dentro del intervalo de temperatura de 6-37°C durante hasta 7 días. Tras el procesamiento de la muestra, el tubo Streck que contenía la muestra de sangre se centrifugó a 1600 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró cuidadosamente la capa de plasma resultante y se transfirió a un tubo de 15 ml. Esta muestra de plasma se centrifugó entonces a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se colocó dentro de un tubo nuevo y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró cuidadosamente la capa de plasma resultante y se colocó dentro de un tubo nuevo, y se procedió entonces a la extracción de ADN libre de células (ADNlc) de la muestra de plasma.

15 *Extracción de ADN libre de células (ADNlc)*

Se usaron aproximadamente 5 ml de plasma de la muestra de plasma para proceder a la extracción de ADN libre de células. Para tubos de recogida de sangre con ADN libre de células (Streck), se usó la página 26 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 4 de la página 28, el periodo de incubación es de 1 hora a 60°C, y en la etapa 15 de la página 29, eluir con 30 µl de tampón AVE.

Selección de SNP

Se seleccionaron diversos SNP para su análisis para estimar el porcentaje de ADNlc derivado del donante presente en la muestra de plasma del sujeto. Los SNP seleccionados para el análisis fueron rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. Para amplificar los SNP, se diseñaron 266 pares de cebadores (Fluidigm).

55 *Amplificación previa de ADN*

Para amplificar regiones seleccionadas como diana que incluyen SNP de interés en el ADN libre de células, se ensamblaron diversos materiales y se usaron en el proceso de amplificación. Se usó la ADN polimerasa Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific). Se diseñaron 266 pares de cebadores y se produjeron (IDT o Fluidigm según el diseño de Fluidigm). Se usaron Exol y tampón Exol (New England BioLabs). Los métodos seguidos incluían el protocolo de amplificación previa de Fluidigm (véase la página 152 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

65 *Amplificación de ADN*

Se amplificó el ADN libre de células de la amplificación previa según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 63 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de amplificación incluían un Access Array de Fluidigm, o chip, la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), disolución de cosecha de Access Array 1X (Fluidigm, PN 100-1031), reactivo de carga de Access Array 20X (Fluidigm) y los 266 pares de cebadores diseñados tal como se describió anteriormente. Los instrumentos usados para este protocolo de amplificación incluían dos controladores IFC AX (Fluidigm) y un ciclador FC1 (Fluidigm).

10 *Indexación (también conocido como marcaje con código de barras)*

Tras amplificarse el ADN libre de células, se indexó el ADN amplificado usando secuencias de índice, también denominadas códigos de barras o etiquetas. La indexación puede hacerse, por ejemplo, para identificar de manera única en cuál de las tres muestras se detectaba cualquier ADN amplificado originado a partir de si moléculas ADN libre de células de todas las muestras van a secuenciarse juntas. El ADN libre de células amplificado se indexó según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 70 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de indexación incluían la polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific) y una biblioteca de códigos de barras de Access Array para secuenciadores de Illumina (Fluidigm, también denominada biblioteca de índices). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Secuenciación

Tras amplificarse e indexarse el ADN libre de células, se secuenció. Se secuenció el ADN libre de células indexado según protocolos de secuenciación de Fluidigm/Illumina para secuenciación múltiple (véase la página 134 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de secuenciación incluían cebadores de secuenciación FL1 y FL2 (Fluidigm), tampón HT1 (Illumina) y un kit de reactivos MiSeq v3 (Illumina). Se secuenció el ADN libre de células usando un instrumento de secuenciación MiSeq (Illumina).

30 *Análisis de datos*

Tras secuenciarse el ADN libre de células, se analizó para determinar la presencia y/o cantidad de diversos alelos de SNP (véase la figura 7 para un esquema general). El análisis primario implicaba la generación de archivos de salida de FASTQ a partir del instrumento MiSeq. El análisis secundario implicaba la alineación de las secuencias de salida secuenciadas mediante MiSeq con la secuencia del genoma humano de referencia. Se realizó el recorte de extremos usando los paquetes de software "Cutadapt" y "Trim-Galore". Se usó el software de alineación "BWA" para realizar la alineación con las regiones genómicas que abarcan el conjunto de amplicones amplificados. Tras completarse la alineación, se asignaron frecuencias de variantes usando el programa de software "SAMtools" y parámetros adaptados para minimizar la inclusión de errores de secuenciación.

El análisis terciario de este tipo de datos implica generalmente aspectos de control de calidad del análisis. Los datos se analizan para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de lecturas para lograr un recuento suficiente para cada posición de SNP y garantizar que no hay alelos adicionales presentes en el receptor. Los datos se analizan también para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo y máximo de loci de SNP por encima del fondo y por debajo del nivel de determinación heterocigoto. Estos límites inferior (fondo) y superior (loci heterocigotos de receptor de trasplante) pueden variar. Además, hay métricas para garantizar ADN de entrada suficiente para lograr una medición exacta determinando la calidad de los datos de SNP heterocigotos. Además, puede determinarse el ADN genómico y asignarse un corte.

Los métodos usados en los datos terciarios determinaron los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra dada. El análisis incluía ajustar la frecuencia de alelo minoritario de los SNP para errores de secuenciación o amplificación restando una tasa de error determinada empíricamente para cada transición o transversión, determinar el conjunto de SNP que tienen una frecuencia de alelo minoritario menor que un corte entre 0,1 y 0,25 como homocigoto en el receptor, luego usar el nivel del alelo minoritario en estos SNP para el cálculo de la contribución del donante como porcentaje del ADN libre de células total. Se eliminaron SNP con valores menores de una frecuencia de alelo minoritario de 0,0008. La mediana del 55,4% inferior de los SNP restantes se dobló y se calculó el promedio con la mediana del 44,6% superior de los SNP para estimar la contribución del donante.

Determinación del estado del órgano trasplantado

Los métodos de análisis de datos descritos anteriormente se usaron para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras de ADN libre de células obtenidas de los receptores de trasplantes. El análisis de datos implicaba la comparación de los niveles de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras con las otras muestras de ese paciente para determinar si los niveles de ADN libre de células derivado del donante estaban aumentando, disminuyendo o estaban manteniéndose a niveles relativamente constantes en ADN libre de células aislado del receptor de trasplante a lo largo del tiempo. Un aumento en los niveles

del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativo de rechazo de trasplante tal como se muestra en la figura 1. La figura 5 muestra la naturaleza estable del porcentaje de ADN libre de células derivado del donante. Esto sugiere que el médico no necesitará ajustar la terapia inmunosupresora en estos pacientes estables.

5 Ejemplo 7-Análisis de ADN libre de células para determinar el estado de un órgano trasplantado en un receptor de trasplante de corazón en combinación con una prueba de expresión génica

Este ejemplo demuestra el análisis de muestras que contienen ADN libre de células de un conjunto de 55 receptores de trasplantes para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en las muestras. Además, se usaron muestras que contienen ARN de células mononucleares de sangre periférica para determinar los niveles de expresión génica tal como se mide usando prueba de expresión molecular AlloMap. Se usaron los niveles de ADN libre de células derivado del donante y expresión génica para diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el receptor de trasplante y predecir el estado futuro del órgano trasplantado, así como para informar de la necesidad de ajustar o mantener las terapias inmunosupresoras que se administran al receptor de trasplante.

15 *Selección de sujetos*

Se seleccionaron pacientes humanos que eran el sujeto de un trasplante de corazón antes de este ensayo tal como se describe en este ejemplo. Los pacientes estaban sometiéndose a tratamiento con terapia inmunosupresora para impedir el rechazo del aoinjerto. Se recogieron muestras de plasma diferenciadas y lisados de células mononucleares de sangre periférica de estos sujetos en las visitas dictadas por la norma asistencial en sus respectivos centros. Los métodos descritos en este ejemplo son aplicables a una o más de las muestras aisladas del receptor de trasplante.

25 *Recogida de ARN, procesamiento y pruebas*

Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se estabilizó el ARN, se aisló el ARN, se creó ADNc y se midió el ADNc mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se describió para las pruebas de expresión molecular AlloMap, un perfil de expresión génica aprobado por la FDA usado para monitorizar receptores de trasplantes de corazón clínicamente estables.

30 *Recogida de plasma*

Se extrajo sangre de los sujetos de modo que pudo extraerse ADN libre de células del plasma aislado de la muestra de sangre. Se recogió la muestra de sangre en tubos de PPT según el método de punción venosa tal como se describió anteriormente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). El tubo de PPT (tubo de preparación de plasma, Becton Dickinson) se llenó completamente con la muestra de sangre. Se retiró el tubo del adaptador y se mezcló inmediatamente mediante inversión suave. Tras la recogida, se centrifugaron los tubos según el protocolo del fabricante y se almacenaron a -80°C. Tras el procesamiento de la muestra, se descongeló el tubo y se retiró cuidadosamente la capa de plasma y se transfirió a un tubo limpio. Esta muestra de plasma se centrifugó entonces a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se colocó dentro de un tubo nuevo y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró cuidadosamente la capa de plasma resultante y se colocó dentro de un tubo nuevo, y se procedió entonces a la extracción de ADN libre de células (ADNlc) de la muestra de plasma.

45 *Extracción de ADN libre de células (ADNlc)*

Se usó aproximadamente 1 ml de plasma de la muestra de plasma para proceder a la extracción de ADN libre de células. Para tubos de preparación de plasma de PPT (Becton Dickinson), se usó la página 22 del protocolo de Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, 2011) con las siguientes modificaciones: en la etapa 15 de la página 25, eluir con 21 µl de tampón AVE.

Selección de SNP

Se seleccionaron diversos SNP para su análisis para estimar el porcentaje de ADNlc derivado del donante presente en la muestra de plasma del sujeto. Los SNP seleccionados para el análisis fueron rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311,

rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689516, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979. Para amplificar los SNP, se diseñaron 266 pares de cebadores (Fluidigm).

Amplificación previa de ADN

Para amplificar regiones seleccionadas como diana que incluyen SNP de interés en el ADN libre de células, se ensamblaron diversos materiales y se usaron en el proceso de amplificación. Se usó la ADN polimerasa Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific). Se diseñaron 266 pares de cebadores y se produjeron (IDT o Fluidigm según el diseño de Fluidigm). Se usaron Exol y tampón Exol (New England BioLabs). Los métodos seguidos incluían el protocolo de amplificación previa de Fluidigm (véase la página 152 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Amplificación de ADN

Se amplificó el ADN libre de células de la amplificación previa según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 63 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de amplificación incluían un Access Array de Fluidigm, o chip, la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Flash II (ThermoFisher Scientific), disolución de cosecha de Access Array 1X (Fluidigm, PN 100-1031), reactivo de carga de Access Array 20X (Fluidigm) y los 266 pares de cebadores diseñados tal como se describió anteriormente. Los instrumentos usados para este protocolo de amplificación incluían dos controladores IFC AX (Fluidigm) y un ciclador FC1 (Fluidigm).

Indexación (también conocido como marcaje con código de barras)

Tras amplificarse el ADN libre de células, se indexó el ADN amplificado usando secuencias de índice, también denominadas códigos de barras o etiquetas. La indexación puede hacerse, por ejemplo, para identificar de manera única en cuál de las tres muestras se detectaba cualquier ADN amplificado originado a partir de si moléculas ADN libre de células de todas las muestras van a secuenciarse juntas. El ADN libre de células amplificado se indexó según el proceso y los protocolos de Access Array de Fluidigm (véase la página 70 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de indexación incluían la polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific) y una biblioteca de códigos de barras de Access Array para secuenciadores de Illumina (Fluidigm, también denominada biblioteca de índices). Los instrumentos usados incluían una máquina de PCR, una centrífuga de placas y un agitador de vórtex.

Secuenciación

Tras amplificarse e indexarse el ADN libre de células, se secuenció. Se secuenció el ADN libre de células indexado según protocolos de secuenciación de Fluidigm/Illumina para secuenciación múltiple (véase la página 134 del sistema Access Array para el sistema de secuenciación de Illumina). Los materiales usados para este protocolo de secuenciación incluían cebadores de secuenciación FL1 y FL2 (Fluidigm), tampón HT1 (Illumina) y un kit de reactivos MiSeq v3 (Illumina). Se secuenció el ADN libre de células usando un instrumento de secuenciación MiSeq (Illumina).

Análisis de datos de ADNlc

Tras secuenciarse el ADN libre de células, se analizó para determinar la presencia y/o cantidad de diversos alelos de SNP (véase la figura 7 para un esquema general). El análisis primario implicaba la generación de archivos de salida de FASTQ a partir del instrumento MiSeq. El análisis secundario implicaba la alineación de las secuencias de salida secuenciadas mediante MiSeq con la secuencia del genoma humano de referencia. Se realizó el recorte de extremos usando los paquetes de software "Cutadapt" y "Trim-Galore". Se usó el software de alineación "BWA" para realizar la alineación con las regiones genómicas que abarcan el conjunto de amplicones amplificados. Tras completarse la

alineación, se asignaron frecuencias de variantes usando el programa de software “SAMtools” y parámetros adaptados para minimizar la inclusión de errores de secuenciación.

5 El análisis terciario de este tipo de datos implica generalmente aspectos de control de calidad del análisis. Los datos se analizan para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo de lecturas para lograr un recuento suficiente para cada posición de SNP y garantizar que no hay alelos adicionales presentes en el receptor. Los datos se analizan también para garantizar que se ha alcanzado el número mínimo y máximo de loci de SNP por encima del fondo y por debajo del nivel de determinación heterocigoto. Estos límites inferior (fondo) y superior (loci heterocigotos de receptor de trasplante) pueden variar. Además, hay métricas para garantizar ADN de entrada suficiente para lograr una medición exacta determinando la calidad de los datos de SNP heterocigotos. Además, puede determinarse el ADN genómico y asignarse un corte.

15 Los métodos usados en los datos terciarios determinaron los niveles de ADN libre de células derivado del donante en una muestra dada. El análisis incluía ajustar la frecuencia de alelo minoritario de los SNP para errores de secuenciación o amplificación restando una tasa de error determinada empíricamente para cada transición o transversión, determinar el conjunto de SNP que tienen una frecuencia de alelo minoritario menor que un corte entre 0,1 y 0,25 como homocigoto en el receptor, luego usar el nivel del alelo minoritario en estos SNP para el cálculo de la contribución del donante como porcentaje del ADN libre de células total. Se eliminaron SNP con valores menores de una frecuencia de alelo minoritario de 0,0008. La mediana del 55,4% inferior de los SNP restantes se dobló y se calculó el promedio con la mediana del 44,6% superior de los SNP para estimar la contribución del donante.

Determinación del estado del órgano trasplantado

25 Los métodos de análisis de datos descritos anteriormente se usaron para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras de ADN libre de células obtenidas de los receptores de trasplantes. El análisis de datos implicaba la comparación de los niveles de ADN libre de células derivado del donante en cada una de las muestras con las otras muestras de esos pacientes para determinar si los niveles de ADN libre de células derivado del donante estaban aumentando, disminuyendo o estaban manteniéndose a niveles relativamente constantes en ADN libre de células aislado de los receptores de trasplantes a lo largo del tiempo. Un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del tiempo es indicativo de rechazo de trasplante tal como se muestra en la figura 1 y la figura 6A. Estas dos figuras muestran la relación entre rechazo bien caracterizado y alto porcentaje de ADN libre de células derivado del donante. La figura 6B muestra la relación entre rechazo bien caracterizado y los resultados de pruebas de expresión molecular AlloMap para la firma de expresión génica. La figura 6C muestra la capacidad de un resultado combinado a partir del ADN libre de células derivado del donante y la expresión génica para discriminar mejor entre rechazo y ausencia de rechazo. Los dos valores (porcentaje de ADNlc-dd y AlloMap) se escalaron al mismo rango y luego se combinaron de manera aditiva para crear una sola puntuación. Esto sugiere que el médico tendrá mejor información sobre el estado del órgano trasplantado si se usan tanto ADNlc como expresión génica y se combinan de este modo o métodos similares.

40 **Bibliografía**

- Clinical and Laboratory Standards Institute. H3-A6, (2012) Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard-sexta edición, vol. 27, nº 26.
- 45 QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, (2011), segunda edición.
- Pakstis AJ, Speed WC, Fang R, Hyland FC, Furtado MR, Kidd JR, Kidd KK. (2010) SNPs for a universal individual identification panel. Hum Genet; 127(3):315-24.
- 50 Access Array System for Illumina Sequencing System, P/N 100-3770, Rev. G1.
- Andreas Wilm, Pauline Poh Kim Aw, Denis Bertrand, Grace Hui Ting Yeo, Swee Hoe Ong, Chang Hua Wong, Chiea Chuen Khor, Rosemary Petric, Martin Lloyd Hibberd and Niranjan Nagarajan. (2012) LoFreq: A sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. Nucleic Acids Res. 40(22):11189-201.

REIVINDICACIONES

1. Método de monitorización del estado de un órgano trasplantado en un sujeto, comprendiendo el método:
- 5 a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante;
- 10 b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en el que el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor;
- 15 c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante, en el que no se realiza genotipado individual del donante y el receptor para determinar qué alelo del SNP pertenece al donante y al receptor; y
- 20 d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en el que un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado.
2. Método de monitorización de la terapia inmunosupresora en un sujeto, comprendiendo el método:
- 25 a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante;
- 30 b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en el que el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor;
- 35 c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante, en el que no se realiza genotipado individual del donante y el receptor para determinar qué alelo del SNP pertenece al donante y al receptor; y
- 40 d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en el que un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado y una base para ajustar la terapia inmunosupresora.
3. Método de ajuste de una terapia inmunosupresora en un sujeto, comprendiendo el método:
- 45 a) proporcionar ADN libre de células de una muestra obtenida de un sujeto que es el receptor de un trasplante de órgano de un donante;
- 50 b) secuenciar un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a partir del ADN libre de células, en el que el panel de SNP es adecuado para diferenciar entre ADN libre de células derivado del donante y ADN libre de células derivado del receptor;
- 55 c) someter a ensayo la varianza en los patrones de distribución de alelos de SNP en el panel en comparación con patrones de distribución homocigotos o heterocigotos esperados para determinar el nivel de ADN libre de células derivado del donante, en el que no se realiza genotipado individual del donante y el receptor para determinar qué alelo del SNP pertenece al donante y al receptor;
- 60 d) diagnosticar el estado del órgano trasplantado en el sujeto, en el que un cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo de un intervalo de tiempo es indicativo del estado del órgano trasplantado; y
- e) ajustar la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que:
- 65 i. un aumento en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de rechazo de trasplante, una necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado;
- ii. una disminución en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de una disminución en la lesión del órgano trasplantado o tolerancia al trasplante, una

necesidad de ajuste de la terapia inmunosupresora y/o una necesidad de investigación adicional del estado del órgano trasplantado; y

- 5 iii. ningún cambio en los niveles del ADN libre de células derivado del donante a lo largo del intervalo de tiempo es indicativo de estado de rechazo de trasplante estable y/u oportunidad de ajuste de la terapia inmunosupresora.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se aumenta.
- 10 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se disminuye.
- 15 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la terapia inmunosupresora que se administra al sujeto se mantiene.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el trasplante de órgano se selecciona del grupo que consiste en un trasplante de riñón, un trasplante de corazón, un trasplante de hígado, un trasplante de pulmón y un trasplante de páncreas.
- 20 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la muestra es una muestra de plasma.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el panel de SNP comprende SNP independientes seleccionados del grupo que consiste en rs1004357, rs10092491, rs1019029, rs1027895, rs10488710, rs10500617, rs1058083, rs10768550, rs10773760, rs10776839, rs1109037, rs12480506, rs1294331, rs12997453, rs13134862, rs13182883, rs13218440, rs1336071, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1490413, rs1498553, rs1523537, rs1554472, rs159606, rs1736442, rs1821380, rs1872575, rs2046361, rs2073383, rs214955, rs2175957, rs221956, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2342747, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs279844, rs2811231, rs2833736, rs2920816, rs315791, rs321198, rs338882, rs3744163, rs3780962, rs4288409, rs430046, rs4364205, rs445251, rs4530059, rs4606077, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs560681, rs5746846, rs576261, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs6811238, rs689512, rs6955448, rs7041158, rs7205345, rs722290, rs7229946, rs740598, rs7520386, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10488710, rs279844, rs1048290, rs1049379, rs1051614, rs1052637, rs1055851, rs1056033, rs1056149, rs1064074, rs1078004, rs10831567, rs6811238, rs11106, rs11210490, rs1126899, rs1127472, rs1127893, rs1130857, rs1049544, rs11547806, rs12237048, rs430046, rs12508837, rs12529, rs12717, rs13184586, rs13295990, rs13428, rs13436, rs1374570, rs14080, rs1411271, rs576261, rs14155, rs1151687, rs1565933, rs1600, rs1678690, rs1881421, rs1897820, rs1898882, rs2056844, rs20575, rs10092491, rs2070426, rs2071888, rs2075322, rs2180314, rs2185798, rs2227910, rs2228560, rs2229571, rs2229627, rs2245285, rs2342747, rs2248490, rs2253592, rs2254357, rs2275047, rs2279665, rs2279776, rs2281098, rs2287813, rs4364205, rs2289751, rs2289818, rs2292830, rs2294092, rs2295005, rs2296545, rs2297236, rs2302443, rs2306049, rs1022478, rs445251, rs230898, rs231235, rs2342767, rs236152, rs2362450, rs2384571, rs2455230, rs246703, rs2480345, rs248385, rs2498982, rs2505232, rs2509943, rs2519123, rs2523072, rs2571028, rs2657167, rs28686812, rs2946994, rs1294331, rs10419826, rs3088241, rs3110623, rs3173615, rs3190321, rs3205187, rs344141, rs35596415, rs362124, rs36657, rs1872575, rs159606, rs3731877, rs3734311, rs3735615, rs3740199, rs3748930, rs3751066, rs3790993, rs3802265, rs3803763, rs1004357, rs3803798, rs3809972, rs3810483, rs3812571, rs3813609, rs3814182, rs3816800, rs3826709, rs3829655, rs3951216, rs1019029, rs408600, rs41317515, rs436278, rs448012, rs475002, rs4845480, rs4849167, rs4865615, rs1027895, rs4890012, rs492594, rs4940019, rs4971514, rs523104, rs528557, rs545500, rs561930, rs57010808, rs57285449, rs10500617, rs6061243, rs609521, rs62490396, rs625223, rs638405, rs6459166, rs648802, rs6510057, rs6764714, rs10768550, rs6790129, rs6794, rs6807362, rs6838248, rs713598, rs7161563, rs726009, rs7289, rs7301328, rs7332388, rs10773760, rs743616, rs743852, rs745142, rs7451713, rs7526132, rs7543016, rs7601771, rs7785899, rs7825, rs8009219, rs10776839, rs8025851, rs8058696, rs8076632, rs8097, rs8103906, rs874881, rs9262, rs9289122, rs936019, rs9393728, rs1109037, rs977070, rs9865242, rs12480506, rs560681, rs12997453, rs13134862, rs13218440, rs1358856, rs1410059, rs1478829, rs1498553, rs1523537, rs4606077, rs1554472, rs1736442, rs1821380, rs2046361, rs214955, rs2175957, rs2255301, rs2269355, rs2270529, rs2272998, rs2291395, rs2292972, rs2399332, rs2503107, rs2567608, rs2811231, rs2833736, rs315791, rs321198, rs6955448, rs338882, rs3780962, rs4288409, rs4530059, rs464663, rs4789798, rs4796362, rs4847034, rs521861, rs1058083, rs5746846, rs590162, rs6444724, rs6591147, rs689512, rs7205345, rs722290, rs740598, rs7520386, rs221956, rs7704770, rs8070085, rs8078417, rs891700, rs901398, rs9546538, rs9606186, rs985492, rs9866013, rs987640, rs13182883, rs9905977, rs993934, rs9951171, rs10274334, rs10421285, rs1043413, rs1044010, rs1045248, rs1045644 y rs1047979.
- 65 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el panel de SNP comprende SNP que

tienen una frecuencia de alelo minoritario en la población global de $>0,4$, una frecuencia de alelo minoritario en la población diana de $>0,4$, la tasa de error de polimerasa más baja de las 6 posibles transiciones o transversiones de alelos y la distancia genómica entre cada SNP independiente es $>500\text{kb}$.

- 5 12. Método según la reivindicación 10, en el que el panel de SNP comprende de aproximadamente 195 a aproximadamente 200, de aproximadamente 200 a aproximadamente 205, de aproximadamente 210 a aproximadamente 215, de aproximadamente 215 a aproximadamente 220, de aproximadamente 220 a aproximadamente 225, de aproximadamente 225 a aproximadamente 230, de aproximadamente 230 a aproximadamente 235, de aproximadamente 235 a aproximadamente 240, de aproximadamente 240 a aproximadamente 245, de aproximadamente 245 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 255, de aproximadamente 255 a aproximadamente 260, de aproximadamente 260 a aproximadamente 265 o de aproximadamente 260 a aproximadamente 266 de los SNP independientes.
- 10
- 15 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la secuenciación del panel de SNP se realiza usando una plataforma de secuenciación múltiplex.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el método comprende además someter a prueba la presencia de un agente infeccioso, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en virus, bacteria, hongos y parásitos.
- 20 15. Método según la reivindicación 14, en el que los virus se seleccionan del grupo que consiste en citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, Anelloviridae y virus BK.
- 25 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el método comprende además realizar uno o más ensayos de obtención del perfil de expresión génica, en el que se calcula una puntuación de combinación basándose en los resultados del nivel de ADN libre de células derivado del donante y los resultados del ensayo de obtención del perfil de expresión génica, preferiblemente en el que el ensayo de obtención del perfil de expresión génica es una prueba AlloMap.

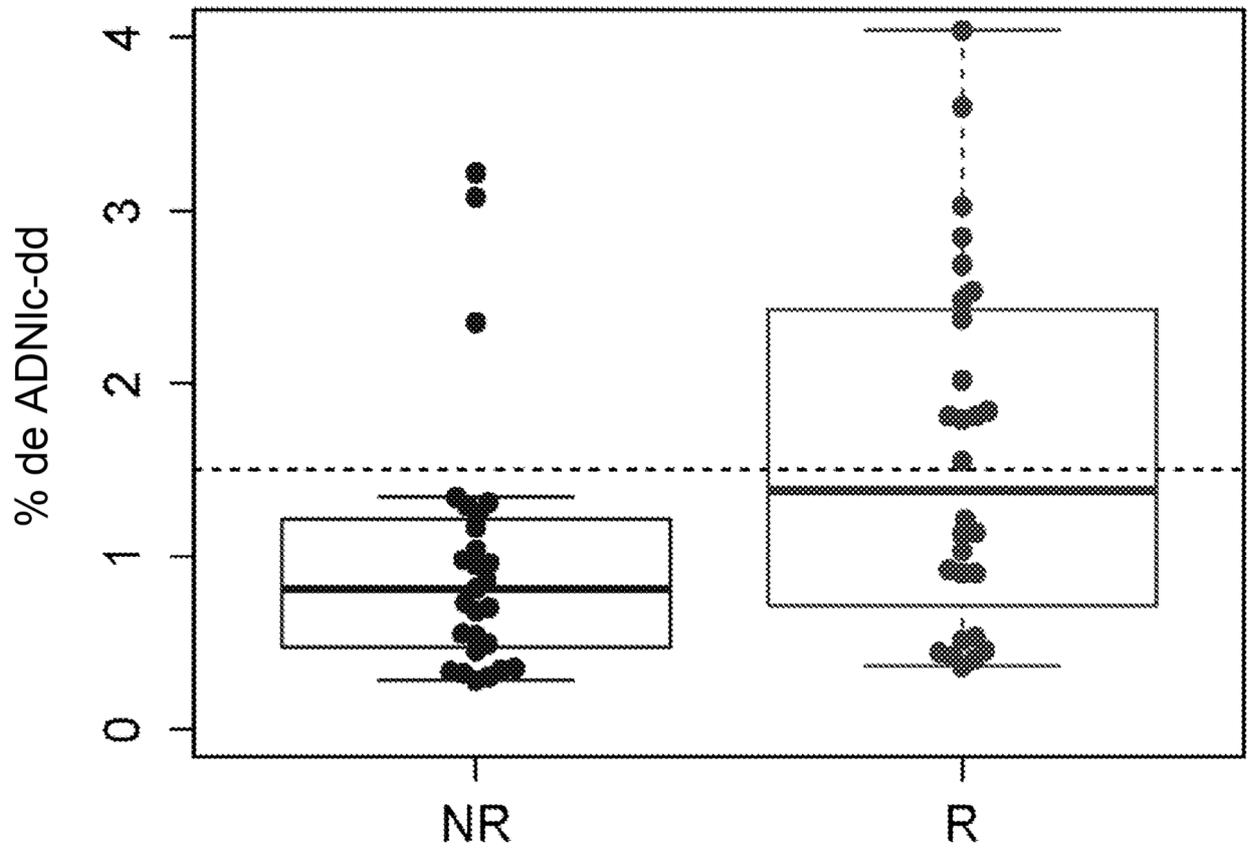


FIG. 1

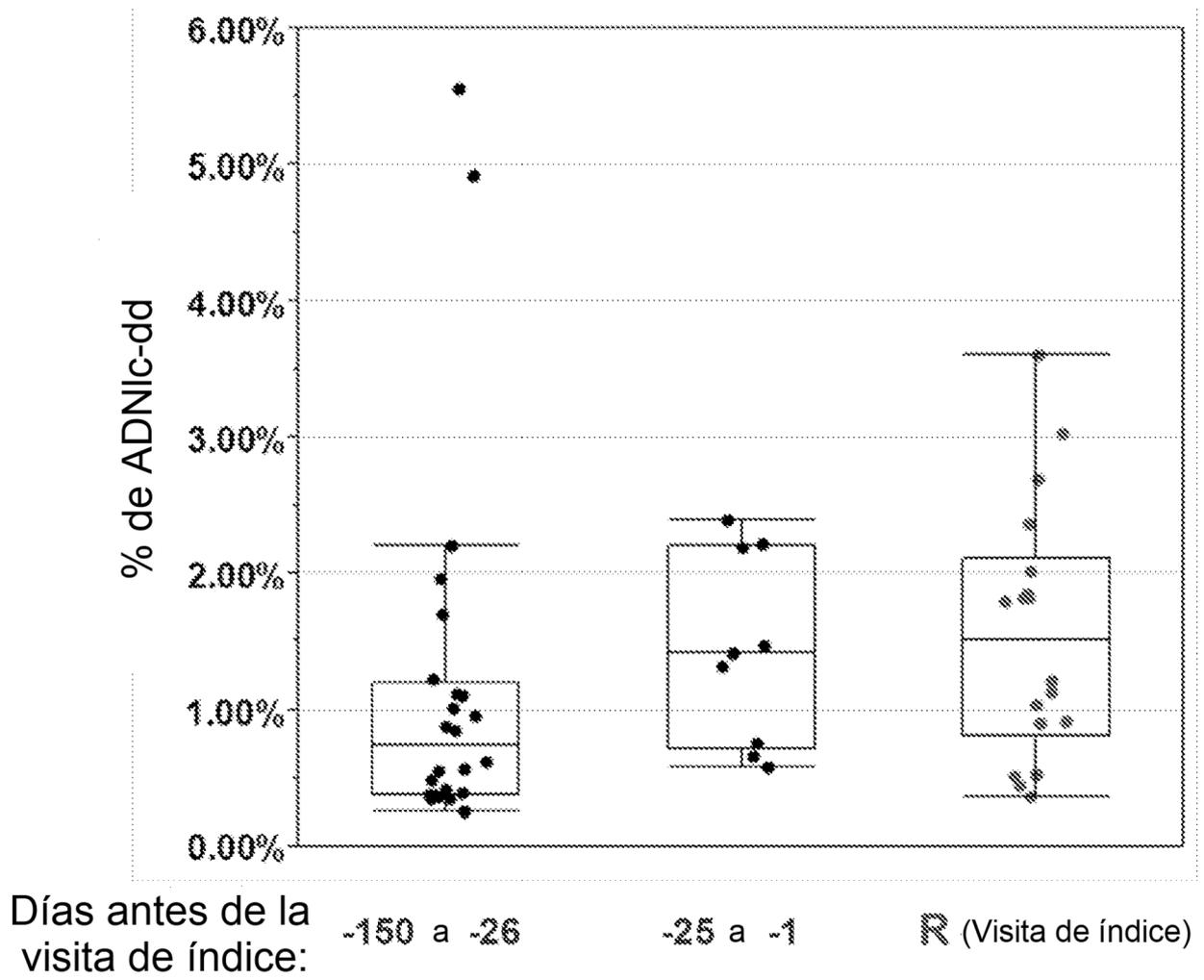


FIG. 2

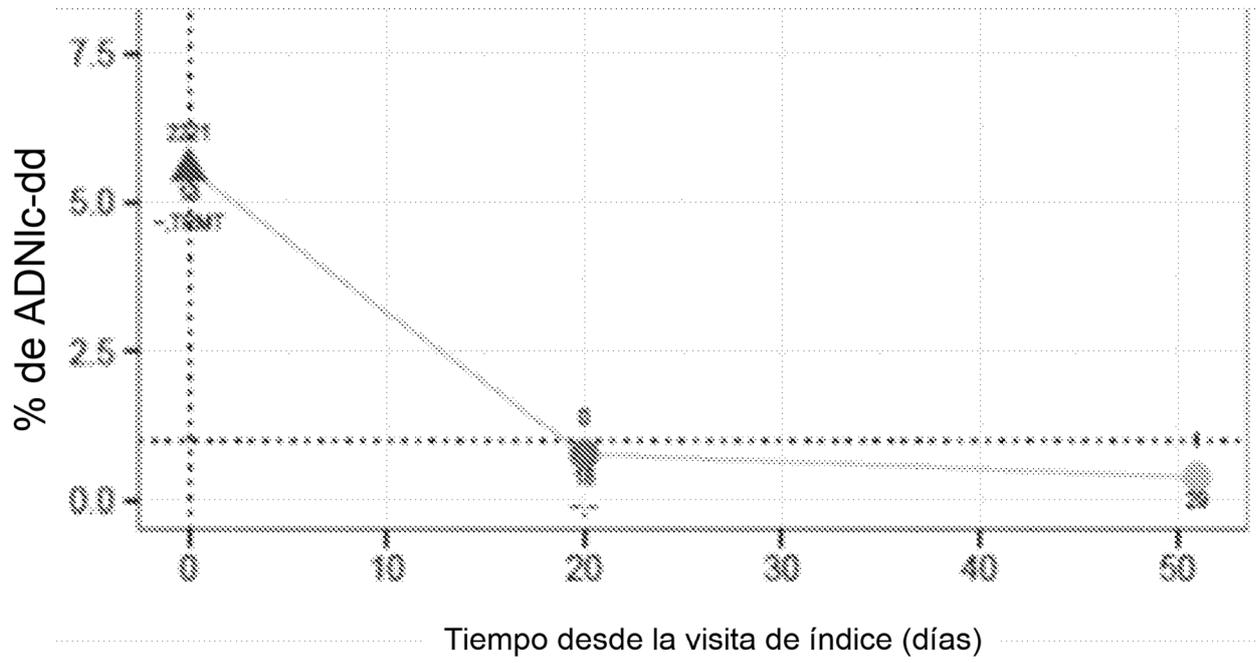


FIG. 3

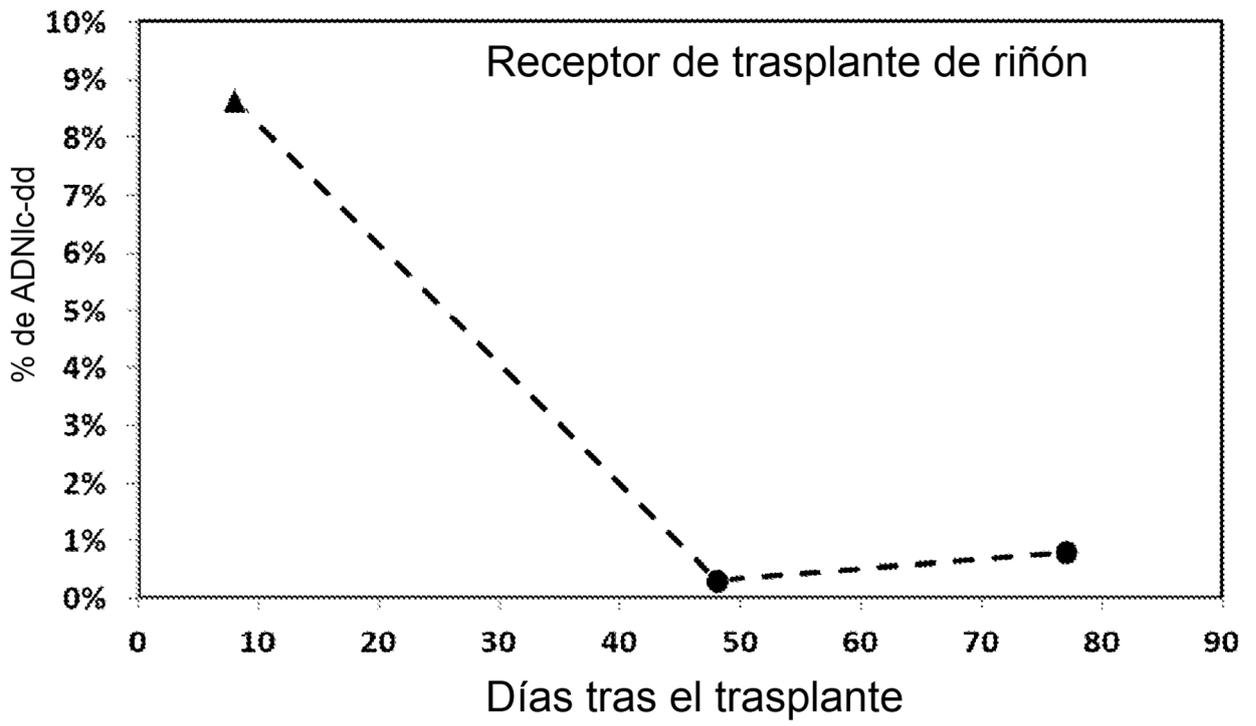


FIG. 4

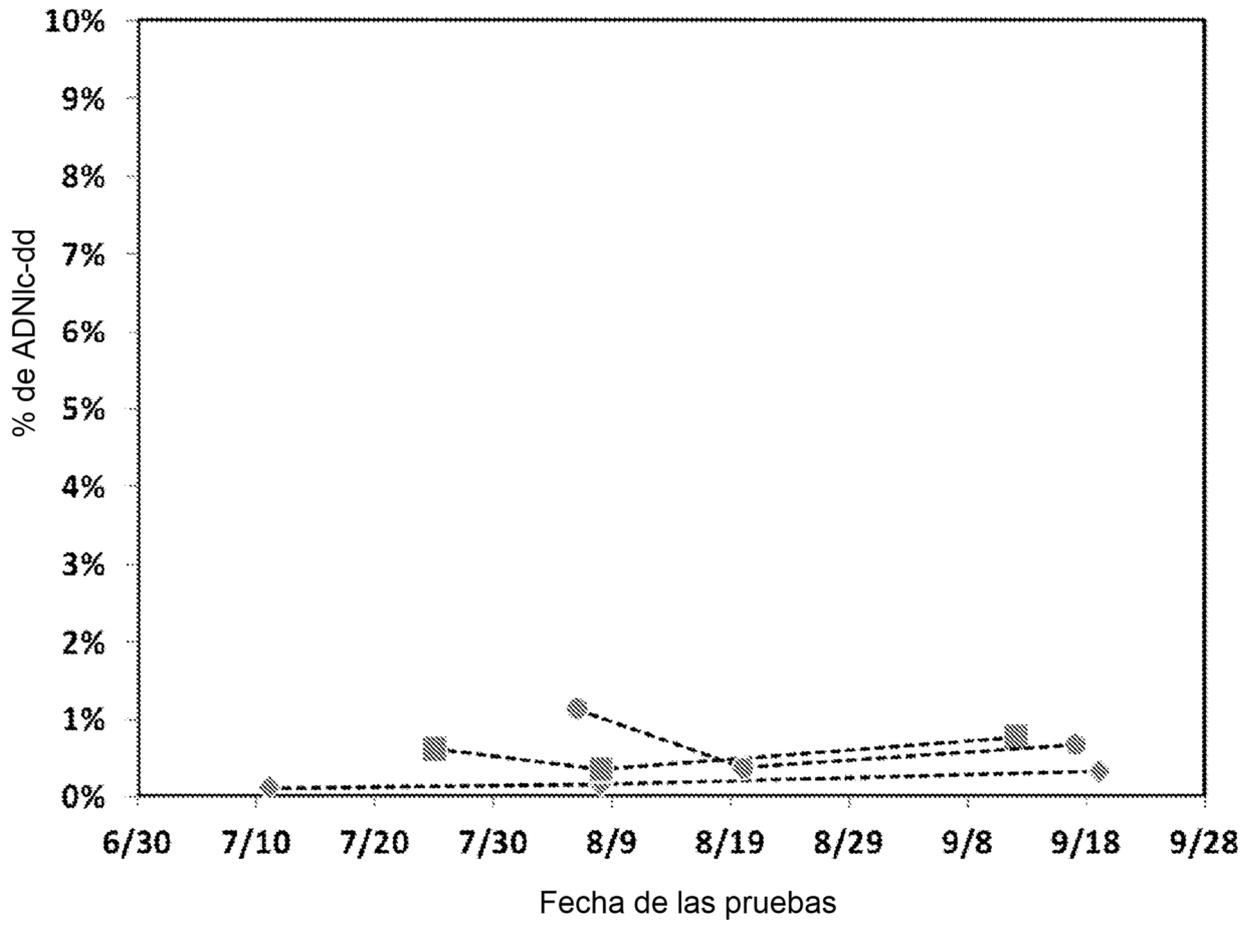


FIG. 5

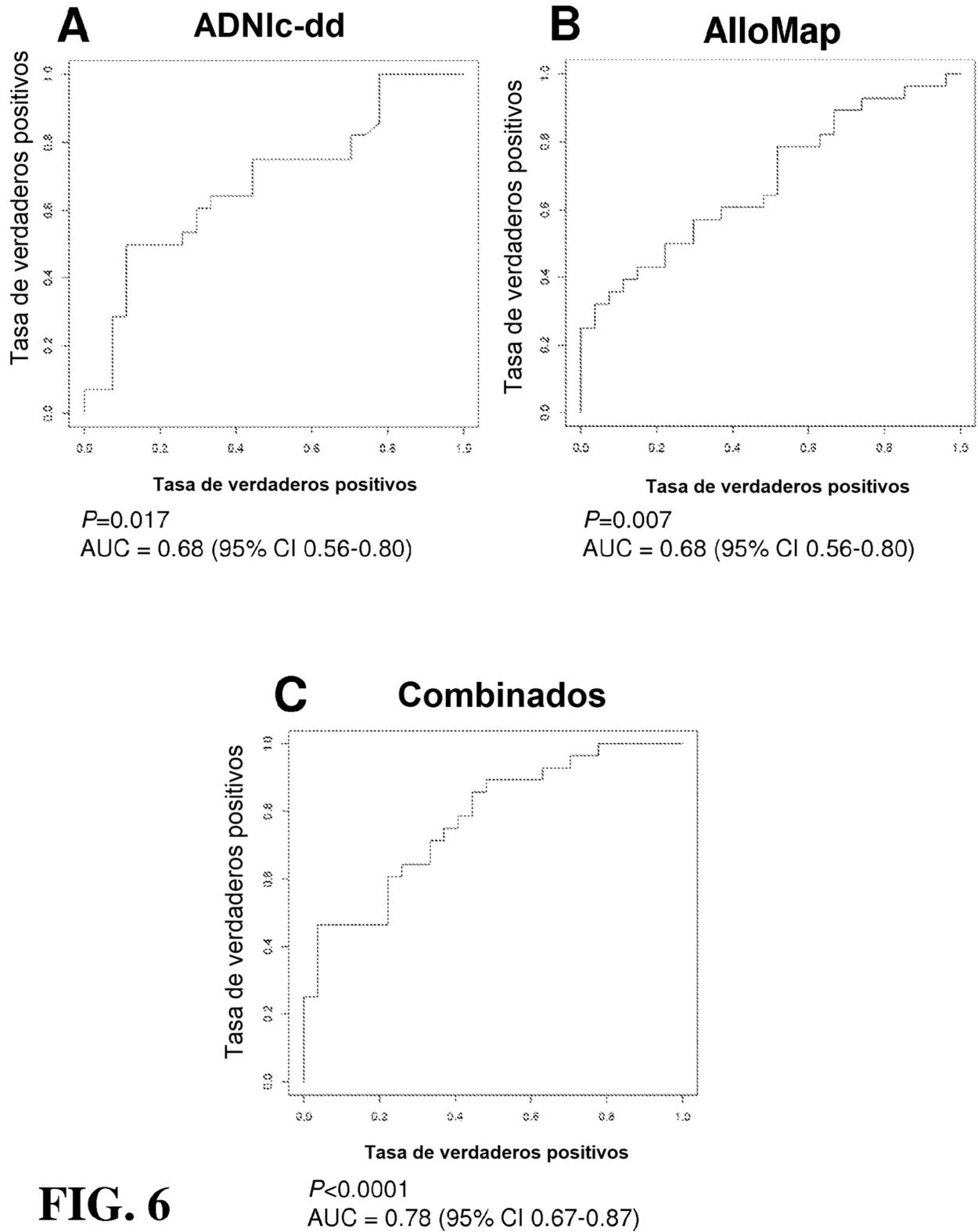


FIG. 6

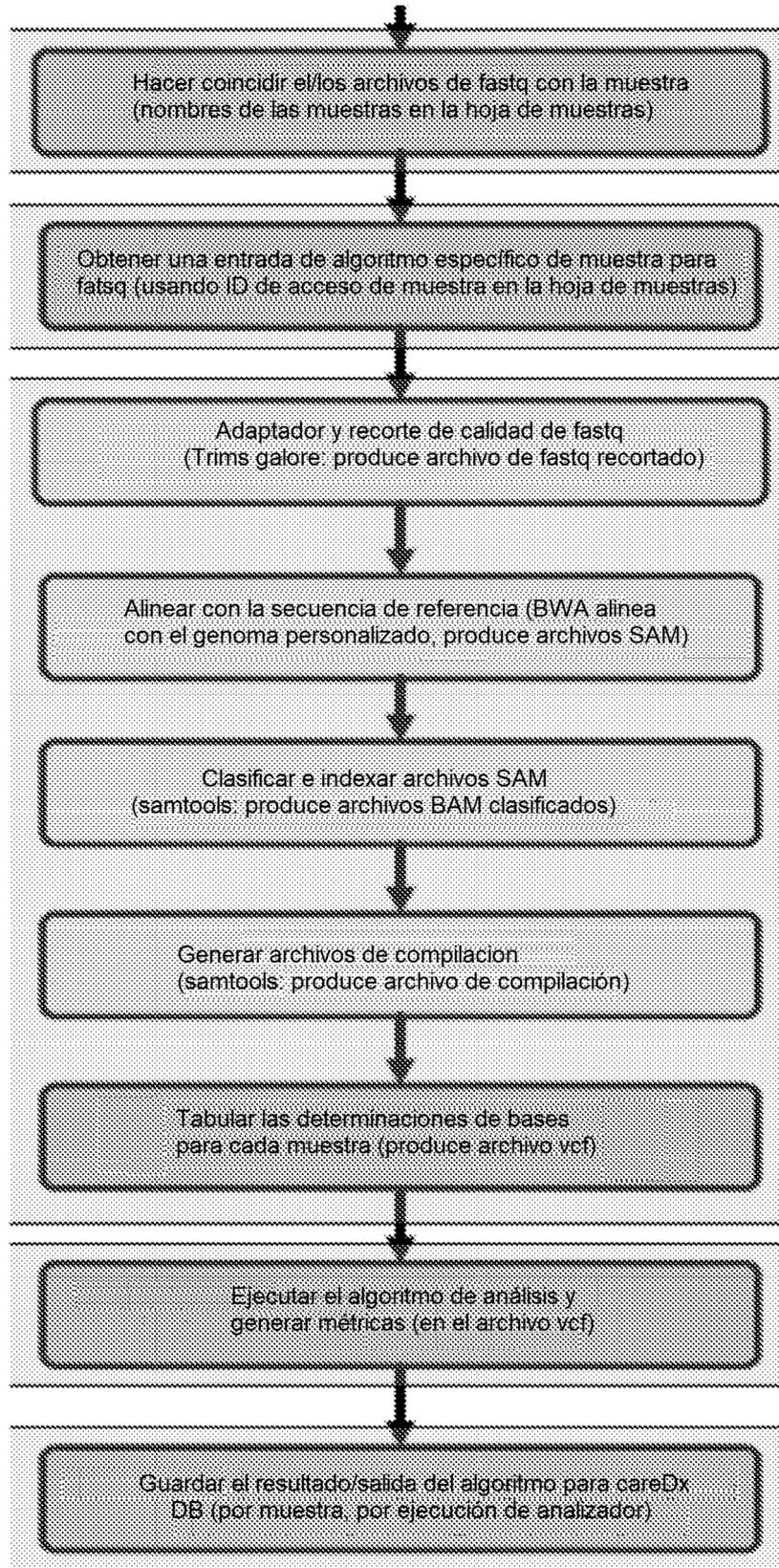


FIG. 7