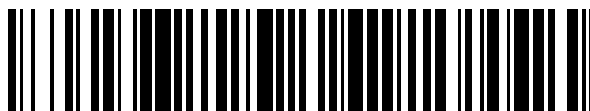


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 328**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2015 PCT/US2015/053304**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16054255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015 E 15848055 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3201361**

54 Título: **Métodos de cuantificación de ADN acelular**

30 Prioridad:

01.10.2014 US 201462058261 P

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

03.11.2020

73 Titular/es:

**CHRONIX BIOMEDICAL (100.0%)
5941 Optical Court, Suite 203E
San Jose, California 95138, US**

72 Inventor/es:

**SCHUTZ, EKKEHARD y
BECK, JULIA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 791 328 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 cuantificación de ADN acelular

5 **Antecedentes de la invención**

La cuantificación de restos de ADN acelular (ADNac) quimérico, es decir, (ADNac que comprende ADN genómico normal de un paciente y ADN de otro individuo o ADN de tejido o células de un paciente que difiere del ADN genómico normal) es útil como marcador diagnóstico en cáncer, en trasplante de órganos sólidos y aneuploidía fetal. Sin embargo, en comparación con otros ensayos bioquímicos establecidos, la estandarización presenta obstáculos, tales como bajas concentraciones y fragmentación de ADNac. La PCR digital permite una alta precisión en la cuantificación, pero para realizar mediciones confiables se requiere un control exhaustivo de errores. La presente invención aborda la necesidad de una cuantificación mejorada para los métodos de PCR digital que evalúan el ADNac quimérico.

15 **Breve resumen de la invención**

A continuación se resumen determinados aspectos de la invención. La invención no se limita a las realizaciones particulares descritas en este resumen.

20 La presente invención proporciona un método de cuantificación de ADNac quimérico en una muestra de un paciente, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una muestra de ADN acelular (ADNac) de una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un paciente;
- 25 (b) realizar una PCR digital multiplex que comprende al menos una primera amplificación y una segunda amplificación, en donde la primera amplificación se dirige a un primer locus genómico de una sola copia y da como resultado la producción de un primer amplicón y una segunda amplificación se dirige a un segundo locus genómico de una sola copia y da como resultado la producción de un segundo amplicón, en donde el primer y el segundo amplicón difieren en longitud en al menos 50 pares de bases;
- 30 (c) determinar la proporción del primer o segundo amplicón en el producto amplificado total a partir de la PCR digital de la etapa (b) para proporcionar un factor de corrección para la fracción amplificable de la muestra de ADNac, y
- (d) corregir una PCR digital diagnóstica realizada en la muestra de ADNac para evaluar el nivel de ADN quimérico presente en la muestra, utilizando el factor de corrección determinado en la etapa (c).

35 En un aspecto, en el presente documento se describe un método para estimar la proporción de ADN en una muestra de ADNac que puede amplificarse en una reacción de PCR, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una muestra de ADN acelular (ADNac) de una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un paciente;
- 40 (b) realizar una PCR digital multiplex que comprende al menos una primera amplificación y una segunda amplificación, en donde la primera amplificación se dirige a un primer locus genómico de una sola copia y da como resultado la producción de un primer amplicón y una segunda amplificación se dirige a un segundo locus genómico de una sola copia y da como resultado la producción de un segundo amplicón, en donde el primer y el segundo amplicón difieren en longitud en al menos 50 pares de bases;
- 45 (c) determinar la proporción del primer o segundo amplicón en el producto amplificado total a partir de la PCR digital de la etapa (b) para proporcionar un factor de corrección para la fracción amplificable de la muestra de ADNac, y
- (d) corregir una PCR digital diagnóstica realizada en la muestra de ADNac para evaluar el nivel de ADN quimérico presente en la muestra, utilizando el factor de corrección determinado en la etapa (c).

En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende además una reacción de amplificación que se dirige al ADN que se añadió a la muestra de sangre, suero o plasma antes de la extracción.

55 En algunas realizaciones, el primer y el segundo amplicones difieren en longitud en 100 nucleótidos o más. En algunas realizaciones, el más largo de los dos amplicones tiene una longitud de 150 a 600 pares de bases o de 150 a 400 pares de bases, y el más corto de los dos amplicones tiene una longitud de 50 a 150 pares de bases.

60 Las muestras de ADNac pueden ser de diversos pacientes. En algunas realizaciones, la muestra de ADNac es de un paciente trasplantado, de un paciente con cáncer o de una paciente gestante. En realizaciones típicas, el paciente es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1: Panel superior: Dibujo esquemático de la disminución de la fracción amplificable (θ Amp) por PCR causada por la fragmentación aleatoria del molde, dado que todos los fragmentos tienen exactamente el mismo tamaño.

Panel inferior: Estimación del factor de corrección para la θ_{Amp} en función del perfil de longitud de fragmentos de ADNac. La línea discontinua (ABC) es la cantidad real, otras líneas representan la eficiencia acumulativa sobre la distribución de la longitud, donde el valor máximo es el factor que puede utilizarse para la corrección del amplicón

5 Figura 2: Optimización del ensayo EvaGreen con cuatro amplicones diferentes. Las reacciones contenían dos amplicones cortos que producían una señal de fluorescencia más baja que la los dos amplicones largos, debido a la menor intercalación de EvaGreen. El panel superior muestra la abundancia fraccional de los dos amplicones largos. Estos valores representan el ddPCR-LI, que se utiliza para corregir la concentración de la ddPCR (*PCR droplet digital*; PCR digital en nanogotas) para calcular el tamaño del molde frente al del amplicón. El panel central muestra las cp/ml calculadas mediante estadísticas de Poisson. Cada muestra se ejecutó en el ensayo 4-plex final, así como en dos reacciones dúplex que contenían solo los cebadores de amplicones cortos o solo los cebadores de amplicones largos. Los resultados 4-plex no son significativamente diferentes de los resultados 2-plex. Panel inferior: Ejemplos de gráficos 2D de señal de fluorescencia obtenidos para las reacciones 4-plex y las dos reacciones dúplex. Para los dos amplicones cortos, los cebadores se añadieron a una concentración ligeramente más baja (0,1 mmol/l) con respecto a la de los dos amplicones más largos (0,15 mmol/l), para mejorar la separación de nanogotas que contenían dos amplicones cortos frente a nanogotas que tenían un amplicón largo. Esto fue necesario para garantizar que la fracción de gotita que contenía dos moldes cortos se podía seguir distinguiendo de la fracción de gotita que contenía un amplicón largo. Asimismo, el ensayo 4-plex no debe contener más de 1 000 equivalentes del genoma haploide (lo que se traduce en aproximadamente 4 000 nanogotas positivas) para permitir una discriminación inequívoca de nanogotas policlonales.

25 Figura 3: A: Las concentraciones de un ADNg cortado y de un ADNg natural se determinaron mediante cinco ensayos diferentes de ddPCR con diversas longitudes de amplicón. El tamaño medio del ADNg cortado fue de 176 pb. La distribución de la longitud se determinó digitalizando el electroferograma de Bioanalyzer y para calcular el factor de corrección de longitud de cada longitud de amplicón se utilizó el área bajo la curva. Después de la corrección, el CV (coeficiente de variación) se redujo del 39 % al 4 % en la medición original. B: se ejecutaron los mismos cinco ensayos en una muestra de ADNac y los factores de corrección se obtuvieron a partir de un modelo basado en perfiles de ADNac. El CV podría reducirse del 25 % al 5 % corrigiendo la longitud del amplicón frente a la del molde.

30 Figura 4: A: Curso temporal de porcentajes de ADNacG B: Curso temporal del índice de longitud por ddPCR de ADNac de las mismas muestras que se muestran en A. La fuerte disminución del ADNac-LI (índice de longitud de ADNac) después de 6 h y 24 h de la reperusión, es causada por la fragmentación sucesiva de los fragmentos de ADNac procedentes de injerto de alto peso molecular en fase dinucleosómica y finalmente en fase mononucleosómica (n = 6 para los puntos temporales: 15 min, 6 h, 6d, 7d, 10d; n = 5 para los puntos temporales: 5d, 8d, 9d; n = 4 para los puntos temporales: 24 h, 4d; n = 3 para el punto temporal: 2d; n = 2 para el punto temporal. C: El porcentaje de ADNacG está muy negativamente correlacionado con la abundancia fraccional de amplicones de mayor tamaño como se determina en el índice de longitud por ddPCR de ADNac

40 Figura 5: A: Distribución por tamaño de ADNac con varias distribuciones numeradas: 1: segundo pico 1/15 del primero; tercer pico 1/75 del primero; 2: segundo pico 1/3 del primero; tercer pico 1/3 del primero; 3: segundo pico 1/1 del primero; tercer pico 1/5 del primero. B: Diagrama de dispersión del ddPCR-LI frente a la θ_{Amp} de amplicón de cuantificación obtenido de simulaciones de una amplia gama de patrones de fragmentación de ADNac. Un polinomio de segundo orden se ajustó a los datos, que logró una regresión muy significativa. C: Se utilizó un total de 210 muestras de 39 pacientes con TSH (trasplante de hígado) desde el día 5 al día 377 después de la cirugía, para estimar la diferencia entre una corrección media y la corrección del contenido de ADNac basándose en el ddPCR-LI. Se representa la desviación relativa definida como $[\text{concentración}_{(\text{corrección media})} - \text{concentración}_{(\text{corrección basada en LI})}] / \text{concentración}_{(\text{corrección basada en LI})}$. Líneas discontinuas: límites del intervalo de confianza del 95 %, línea continua: desviación media. D: Concentraciones medidas con QX100/200 (izquierda) y los valores después de corregir la eficiencia de extracción (derecha) como porcentaje del valor final (después de todas las correcciones).

Descripción detallada de la invención

55 La expresión "ADN acelular" o "ADNac", como se usa en el presente documento, significa moléculas de ADN libre con una longitud de 25 nucleótidos o mayor que no están contenidas dentro de ninguna célula intacta. En el contexto de la actual invención, el "ADNac" se evalúa normalmente en sangre humana, por ejemplo, puede obtenerse de suero o plasma humano.

60 En el presente documento, el término "quimérico" o "mosaico" en el contexto de ADNac, se usa para referirse a ADNac en un paciente que comprende ADN normal y ADN que no es normal para el paciente, es decir, el ADN es de otro individuo, tal como de un donante de trasplante o ADN fetal; o es del paciente, pero no de un tejido normal, por ejemplo, ADN de células cancerosas.

65 Generalmente, el ADNac está fragmentado. Por ejemplo, en el ADNac humano, regularmente se observan tres picos distintos que se asemejan a las tres primeras fracciones más cortas de fragmentación de ADN apoptótico. Como se usa en el presente documento, la "proporción de ADN amplificable" o "fracción de ADN amplificable" en una muestra

de ADNac, se refiere a la cantidad de ADN en una muestra que puede proporcionar un producto amplificado de un tamaño de interés, como una fracción del ADN presente total de la misma región que podría amplificarse si no hubiera fragmentación.

- 5 Un "injerto", como se usa en el presente documento, se refiere a material tisular de un donante que se trasplanta a un receptor. Por ejemplo, un injerto puede ser de hígado, corazón, riñón o de cualquier otro órgano.

10 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que actúa como un punto de inicio de la síntesis de ADN en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de cuatro nucleósido trifosfatos distintos y un agente de polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Un cebador es preferentemente un oligodesoxirribonucleótido monocatenario. El cebador incluye una "región de hibridación" exacta o sustancialmente complementaria a la secuencia diana, preferentemente, con una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos. Un oligonucleótido cebador puede consistir completamente en la región de hibridación o puede contener características adicionales que permitan la detección, inmovilización o manipulación del producto amplificado, pero que no alteran la capacidad del cebador para servir como reactivo de partida para la síntesis de ADN. Por ejemplo, en el extremo 5' del cebador puede incluirse una cola de secuencia de ácido nucleico que se hibride con un oligonucleótido de captura.

20 El término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida de forma selectiva con un ácido nucleico diana en condiciones adecuadas. Para la detección de las secuencias biomarcadoras descritas en el presente documento, una sonda puede tener cualquier longitud, por ejemplo, una longitud de 15-500 pb. Normalmente, en los ensayos basados en sondas, se prefieren sondas de hibridación cuya longitud sea inferior a 50 pb.

25 La expresión "secuencia diana" o "región diana" se refiere a una región de un ácido nucleico que se va a analizar y que comprende el sitio de interés, por ejemplo, una región que contiene un biomarcador SNP (forma siglada de *single-nucleotide polymorphism*, polimorfismo mononucleotídico).

30 Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido", se refieren a cebadores, sondas y fragmentos oligoméricos. Los términos no están limitados por la longitud y son genéricos para los polímeros lineales de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro N-glucósido de una base purínica o pirimidínica, o bases purínicas o pirimidínicas modificadas. Estos términos incluyen ADN bicatenario y monocatenario, así como ARN bicatenario y monocatenario. Los oligonucleótidos para su uso en la invención, se pueden usar como cebadores y/o sondas.

40 Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados que incluyen, pero sin limitación, un fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato puenteado, metilfosfonato puenteado, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato puenteado o enlaces sulfona, y combinaciones de dichos enlaces.

45 Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido, puede comprender las cinco bases de origen biológico (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco bases de origen biológico. Estas bases pueden servir para diversos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para promover o inhibir la degradación de sondas; o como puntos de unión para fracciones detectables o fracciones de desactivación. Por ejemplo, un polinucleótido puede contener una o más fracciones de base modificadas, no estándar o derivatizadas, incluyendo, pero sin limitación, N6-metil-adenina, N6-*terc*-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5 bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5 (carboxihidroximetil)uracilo, 5 carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5 carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6 isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2 tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de fracciones de bases modificadas, no estándar o derivatizadas, pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Asimismo, un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido, puede comprender una o más fracciones de azúcar modificadas que incluyen, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

60 Las "secuencias repetitivas" se refieren a elementos de ADN muy repetidos presentes en un genoma. Por lo general, estas secuencias se clasifican en familias de secuencias y en términos generales se clasifican como ADN repetitivo intercalado (véase, por ejemplo, Jelinek y Schmid, Ann. Rev. Biochem. 51:831-844, 1982; Hardman, Biochem J. 234:1-11, 1986; y Vogt, Hum. Genet. 84:301-306, 1990) o ADN repetido en tándem. Los elementos repetitivos incluyen ADN satélite, minisatélite y microsatélite. En seres humanos, el ADN repetitivo intercalado incluye secuencias *Alu*, elementos nucleares cortos intercalados (*SINES*, *short interspersed nuclear elements*) y elementos nucleares largos

intercalados (LINES, *long interspersed nuclear elements*) y retrovirus endógenos (ERV, *endogenous retroviruses*). La categorización de elementos repetitivos y de familias de elementos repetitivos y sus secuencias consenso de referencia, se definen en bases de datos públicas (por ejemplo, rebase (versión 12.09) - Genetic Information Research Institute (Jurka et al., Cytogenet Genome Res 2005;110:462-7)).

5 Una "secuencia única" como se usa en el presente documento es una secuencia que está exenta de ADN repetido que puede localizarse en un solo sitio en un genoma. Una secuencia "única" en el contexto de la presente invención, es equivalente a una secuencia de una sola copia.

10 Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "uno(a)", "el" y "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye una pluralidad de dichas moléculas, y similares.

15 **Introducción**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de un método para cuantificar con mayor precisión ADNac, en particular, el ADNac quimérico es una muestra de un paciente.

20 Los métodos de la invención comprenden realizar múltiples reacciones de control de PCR que dan como resultado al menos dos amplicones de diferente longitud (un amplicón "largo" y uno "corto") para controlar la parte de ADN en una muestra que puede amplificarse por PCR. Los amplicones se generan amplificando secuencias únicas presentes en el genoma. La fracción de uno (o ambos) de los amplicones obtenidos en la reacción se usa después para determinar la fracción de ADN que puede amplificarse por PCR, es decir, la fracción que puede amplificarse mediante una PCR de una longitud deseada.

25 El método comprende realizar una PCR digital en una muestra de ADNac obtenida de un paciente. Normalmente, el ADNac se aísla de sangre, suero o plasma. Se realiza una PCR digital que incluye al menos dos reacciones de amplificación para proporcionar amplicones de una longitud deseada donde los dos amplicones difieren en longitud en al menos 50 pares de bases, y normalmente difieren en longitud en al menos 75 o 100 pares de bases. Usando la abundancia fraccional de un amplicón para evaluar el patrón de fraccionamiento, se puede calcular un factor para corregir la fracción amplificable de la PCR, es decir, la fracción que puede amplificarse mediante la PCR de diagnóstico que se evalúa en el análisis, para cuantificar la concentración de ADNac. La reacción de control de PCR de dos longitudes, se realiza individualmente en una muestra de ADNac del paciente, normalmente antes de, una PCR cuantitativa para el diagnóstico, por ejemplo, un análisis SNP para determinar el estado de un órgano de trasplante, en una PCR multiplex.

30 La PCR de control puede comprender además un ADN "*spike-in*", es decir, ADN de control añadido a la muestra inicial obtenida de un paciente, por ejemplo, una muestra de sangre, plasma o suero, para controlar la eficiencia de extracción del ADNac de la muestra del paciente.

40 **Identificación de secuencias únicas para controles de PCR de dos longitudes**

Se selecciona una secuencia única del genoma para que sirva como secuencia diana para su uso para generar un amplicón largo o corto como control. La secuencia única diana para generar el amplicón largo es diferente de la secuencia única diana que se usa para generar el amplicón corto. Se puede usar cualquier secuencia única en el genoma. El único criterio para la selección es que la secuencia se localiza en un solo locus y que los cebadores de amplificación se pueden usar para amplificar selectivamente la secuencia única para proporcionar un amplicón de una longitud deseada.

50 La longitud de los amplicones cortos y largos que se utilizan para estimar el ADNac que puede amplificarse por PCR normalmente varía en al menos 100 pb o más. Normalmente, el amplicón corto tiene una longitud menor que 150 pares de bases, pero tiene una longitud mayor que 30 pares de bases y el amplicón largo tiene una longitud de al menos 150 pares de bases y puede tener una longitud de hasta 250 pares de bases o mayor. Normalmente, el amplicón largo tiene una longitud menor que 600 pares de bases y con frecuencia una longitud menor que 400 o 300 pares de bases.

60 Los expertos en la materia conocen bien la selección y el diseño de cebadores para amplificar una secuencia única para proporcionar un amplicón de control de la longitud deseada. Por ejemplo, los cebadores de PCR pueden diseñarse usando técnicas de programas informáticos de diseño de cebadores estándar conocidos por personas expertas en la materia. Las variables consideradas durante el diseño del cebador de PCR pueden incluir la longitud del cebador, el contenido de pares de GC, la temperatura de fusión y el tamaño del ácido nucleico diana amplificado por el par de cebadores.

65 Amplificación de ADN

Las reacciones de amplificación se realizan en ADNac obtenido una muestra, normalmente sangre, suero o plasma,

de un paciente. Las reacciones de amplificación realizadas de acuerdo con la invención comprenden PCR digital.

La PCR digital es una técnica en la que se realiza una dilución limitante de la muestra a través de un gran número de reacciones de PCR individuales para que la mayoría de las reacciones no tengan moléculas molde y den un resultado de amplificación negativo. Las reacciones que son positivas en el punto final de la reacción se cuentan como moléculas molde individuales presentes en la muestra original en una relación de 1 a 1. (Véase, por ejemplo, Kalina et al. NAR 25:1999-2004 (1997) y Vogelstein y Kinzler, PNAS 96:9236-9241 (1999); patentes de Estados Unidos N.º 6.440.706, 6.753.147 y 7.824.889.) Se supone una división cuantitativa, y el intervalo dinámico se rige por el número de recipientes disponibles para la separación estocástica. Después, las moléculas se detectan por PCR y se cuenta el número de recipientes positivos. Cada amplificación exitosa se cuenta como una molécula, independiente de la cantidad real de producto. En algunas realizaciones, una PCR digital puede ser una PCR digital basada en microfluidica. En algunas realizaciones, puede emplearse PCR digital en nanogotas.

La fracción amplificable puede determinarse evaluando la cantidad de amplicón largo o corto obtenido en la PCR digital. Esto puede calcularse utilizando cualquier número de parámetros de cálculo. En algunas realizaciones, el tamaño del amplicón de la PCR de cuantificación se utiliza como una variable independiente. Por ejemplo, utilizando amplicones de 249 pares de bases y de 93 pares de bases:

$$\text{Ecuación 1} \quad D=0,043 \cdot \text{Lamp}^{(L+0,15)} - 0,093 \cdot \text{raíz cuadrada}(\text{Lamp}) + 1,27$$

$$r^2 = 0,992$$

$$\text{Ecuación 2} \quad \theta \text{Amp} = 1,431D^4 - 3,931D^3 + 3,271D^2 + 0,129D + 0,03$$

$$r^2 = 0,999$$

Se considera que una PCR en una muestra de ADNac que proporciona un intervalo de trabajo de entre 25 y 200 pares de bases para Lamp, es normalmente aceptable para la evaluación diagnóstica de la muestra de ADNac usando las ecuaciones proporcionadas en [0032].

Uso de controles con PCR diagnóstica

Para cuantificar el ADNac quimérico (o mosaico), se puede usar una PCR de control de acuerdo con la invención, para determinar la fracción amplificable de una muestra de ADNac con cualquier número de PCR diagnóstica realizada en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra de ADNac es de un paciente trasplantado que se analizará para determinar la presencia, o la proporción, de ADN en la muestra que se origina de un donante de injerto (véase, por ejemplo, el documento PCT/US2014/040055). En algunas realizaciones, el ADNac es una muestra de ADNac materno para evaluar el ADN fetal. En algunas realizaciones, el ADNac es de un paciente con cáncer que se analizará para detectar la presencia, o la proporción, de ADN en la muestra que se origina en las células malignas.

Un "paciente", en el contexto de esta invención, es cualquier individuo que se va a evaluar usando un ensayo de diagnóstico de ADNac. En realizaciones típicas, el paciente es un ser humano. En otras realizaciones, el paciente es un mamífero, por ejemplo, un murino, bovino, equino, canino, felino, porcino, ovino, caprino, o un primate.

Análisis informático

En el presente documento se describen sistemas relacionados con los métodos anteriores de la invención. En un aspecto, en el presente documento se describe un sistema para analizar ADN acelular circulante, que comprende: (1) analizar una muestra para ejecutar el método de analizar ADNac en una muestra de sangre, suero o plasma de un paciente usando una PCR de dos longitudes para calcular la fracción amplificable de una muestra de ADNac como se describe anteriormente; (2) un sistema informático para recibir y analizar automáticamente los datos obtenidos en la etapa (1) para proporcionar un factor de corrección para calcular en el ADNac la fracción de ADN amplificable.

La función de análisis basada en ordenador se puede implementar en cualquier lenguaje y/o navegadores adecuados. Por ejemplo, puede implementarse con lenguaje C y, preferentemente, utilizando lenguajes de programación de alto nivel orientados a objetos, tal como Visual Basic, SmallTalk, C++ y similares. La aplicación se puede escribir para adaptarse a entornos tales como el entorno de Microsoft Windows™, incluyendo Windows™ 8, Windows™ 7, Windows™ 98, Windows™ 2000, Windows™ NT y similares. Además, la aplicación también puede escribirse para entorno Macintosh™, SUN™, UNIX o LINUX. Además, las etapas funcionales también se pueden implementar utilizando un lenguaje de programación universal o independiente de una plataforma. Los ejemplos de dichos lenguajes de programación multiplataforma incluyen, aunque sin limitación, lenguaje de marcado de hipertexto (HTML, *hypertext markup language*), JAVA™, JavaScript™, lenguaje de programación Flash, interfaz común de pasarela/lenguaje de consulta estructurada (CGI/SQL, *common gateway interface/structured query language*), lenguaje práctico de extracción e informes (PERL, *practical extraction report language*), AppleScript™ y otros lenguajes de secuencia de comando del sistema, lenguaje de programación/lenguaje de consulta estructurado (PL/SQL, *programming language/structured query language*) y similares. Se pueden utilizar navegadores habilitados

para Java™ o JavaScript™ como HotJava™ o Microsoft™ Explorer™. Cuando se usan páginas de internet de contenido activo, pueden incluir *applets* de Java™ o controles ActiveX™, u otras tecnologías de contenido activo.

5 La función de análisis también puede incorporarse en productos de programas informáticos y utilizarse en los sistemas descritos anteriormente, u otros sistemas informáticos o basados en internet. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un producto de programa informático que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene códigos de programa legibles por ordenador o instrucciones incorporadas en él, para permitir que un procesador lleve a cabo las funciones de análisis y correlación como se describe anteriormente. Estas instrucciones de programa informático se pueden cargar en un ordenador u otro aparato programable para producir una máquina, de tal forma que las instrucciones que se ejecutan en el ordenador o en otro aparato programable creen medios para implementar las funciones o etapas descritos anteriormente. Estas instrucciones de programa informático también pueden almacenarse en una memoria o medio legible por ordenador que puede dirigir un ordenador u otro aparato programable para que funcione de una manera en particular, de tal forma que las instrucciones almacenadas en la memoria o el medio legible por ordenador produzcan un artículo de fabricación que incluya medios de instrucción que implementen el análisis. Las instrucciones del programa informático también se pueden cargar en un ordenador u otro aparato programable para provocar que se realice una serie de etapas operativas en el ordenador u otro aparato programable, para producir un proceso implementado en el ordenador de forma que las instrucciones que se ejecutan en el ordenador u otro aparato programable proporcionen etapas para implementar las funciones o etapas descritas anteriormente.

20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo como ilustración y no como limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Los siguientes ejemplos describen el desarrollo de un ensayo de ADNac cuantitativo mejorado.

30 *Pacientes, Material y métodos*

En este ejemplo, se analizaron muestras de sangre de 43 pacientes después de un trasplante de hígado (TsH). Este análisis también empleó muestras de voluntarios sanos que se obtuvieron con consentimiento informado. Se extrajo sangre entera con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y se procesó en 4 horas y se conservó congelada a -80° C hasta su extracción. Para pacientes con TsH, se utilizaron tubos de ADNac (9 ml Cell-Free DNA™ BCT, Streck Inc., Omaha, NE). Las muestras de pacientes con TsH se extrajeron bajo un protocolo con consentimiento informado aprobado por un comité de revisión institucional.

Extracciones de ADNac

40 Antes de la extracción, todas las muestras de plasma se centrifugaron a 4 000 xg durante 20 minutos a 4° C. El ADNac se extrajo utilizando el kit de Roche High Pure Viral Extraction Large Volume (LV) (ROCHE LV, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Medición y corrección del tamaño de los fragmentos

45 La distribución del tamaño de múltiples muestras de ADNac se estimó utilizando un BioAnalyzer 2000 con el kit de ADN de alta sensibilidad (Agilent, Waldbronn, Alemania). El contenido de ADN de cada pico distinto se determinó utilizando el programa informático del dispositivo, la distribución dentro de cada pico se calculó después de digitalizar los electroferogramas en intervalos (mínimo 10/pico). Generalmente, en el ADNac humano, regularmente se observan tres picos distintos que se asemejan a las tres primeras fracciones más cortas de fragmentación de ADN apoptótico. La fórmula general para corregir la fracción del molde amplificable (θ_{Amp}) de cualquier longitud de amplicón y longitud de molde dada es (Figura 1):

$$ADN_{\text{longitud corregida}} = ADN_{\text{medido}} \frac{\text{Longitud de molde}}{\text{longitud de molde} - \text{longitud de amplicón}}$$

55 El intervalo de distribuciones observadas se utilizó para estimar la θ_{Amp} en ADNac, por modelado iterativo de perfiles de ADNac en R.

60 R simulación 1: Simulaciones de perfiles de ADNac para la eficiencia de amplificación por PCR. Las simulaciones de perfiles de ADNac se calcularon en lenguaje de programación estadística R (dirección <http://www.r-project.org/>). Los extremos de la simulación se establecieron en aquellos que se han observado mediante separaciones electroforéticas capilares de ADN plasmático. Los parámetros fueron los siguientes: Primer pico: tamaño como 180 pb ± 20 (cantidad relativa: 33 a 99 %), segundo pico: tamaño como 360 pb ± 30 (cantidad relativa: 5 a 50 %), tercer pico: tamaño como 560 pb ± 40 (0 a 33 %). Se supuso que los picos eran gaussianos distribuidos con los parámetros dados. Los tres picos se concatenaron en un perfil de ADNac y la fracción amplificable θ_{Amp} se calculó de acuerdo con la fórmula

dada en el texto.

Se usaron cinco ensayos diferentes basados en sondas con longitudes de amplicón variables para determinar la concentración [cp/20 ml] de 10 ng de ADN_g cortado, ADN_g natural y ADN_{ac} extraídos de plasma de voluntarios sanos. Para corregir los resultados obtenidos para las cinco longitudes de amplicón diferentes, cuando se realiza en ADN cortado, el ADN cortado utilizado se sometió a electroforesis capilar y se ajustó un modelo a la forma de curva observada. La θ_{Amp} teórica calculada se utilizó para corregir las 5 longitudes de las ddPCR. Los factores de corrección de la θ_{Amp} utilizados para el ADN_{ac} se obtuvieron de las simulaciones de perfiles de ADN_{ac}.

10 Perfiles de fragmentación por ddPCR

Se evaluó un índice de longitud (ddPCR-LI, siglas del inglés *length index*) de ADN_{ac} mediante una ddPCR tetraplex realizada en 20 ml de 1x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix. Para aumentar el número de nanogotas positivas, se combinaron dos amplicones cortos (92 pb y 94 pb) y dos amplicones largos (248 pb y 250 pb). Para detalles del ensayo con cuatro amplicones diferentes véase la figura 2. El ddPCR-LI se definió como la abundancia fraccional de los amplicones largos. Se simuló una amplia gama de perfiles de ADN_{ac} como se indicó anteriormente; los ddPCR-LI se calcularon y se registraron junto con la θ_{Amp} de cuantificación por ddPCR y se utilizaron para modelar la dependencia del factor de corrección de cuantificación θ_{Amp} a partir de perfiles de ADN_{ac} estimados utilizando el ddPCR-LI.

20 Resultados

Examen de errores: Corrección de la longitud de amplicón frente a longitud de molde

Para evaluar la influencia del molde fragmentado al azar y la longitud del amplicón sobre el rendimiento del ensayo, se utilizaron cinco ensayos diferentes basados en sondas para cuantificar una muestra de ADN_g cortado frente a la misma cantidad de ADN_g natural. Las concentraciones medidas en el ADN cortado dependen en gran medida de la longitud del amplicón. La variabilidad entre los ensayos y la subestimación de las concentraciones de ADN se eliminó corrigiendo las concentraciones medidas para el amplicón y la longitud del molde (Figura 3), utilizando un factor θ_{Amp} calculado a partir de un modelo de ajuste del perfil de longitud. Cuando se utilizó ADN_{ac} como molde, la corrección de la longitud redujo el CV del 25 % al 5 %; procediendo en este caso los factores de un modelo basado en perfiles de ADN_{ac}.

Índice de longitud de ADN_{ac} medido por ddPCR

En la mayoría de las muestras clínicas de plasma, la distribución de tamaño de ADN_{ac} se asemeja a la del patrón de escalera de ADN apoptótico, con tres fracciones de longitud características de aproximadamente 180 pb, 360 pb y 540 pb y con la mayoría de las moléculas presentes en la fracción de 180 pb. Para evaluar la distribución del tamaño de los fragmentos de ADN_{ac} presentes en una muestra particular, se utilizó un ensayo de ddPCR con la mezcla maestra EvaGreen y amplicones de dos longitudes diferentes (94 pb y 249 pb). El índice de longitud por ddPCR refleja la abundancia fraccional de los dos amplicones más largos y se determinó primero para un conjunto de 10 muestras de ensayo de ADN_{ac} para las cuales también se determinó el perfil de fragmentación utilizando el Bioanizador Agilent. El ddPCR-LI estaba muy negativamente correlacionado ($r = -0,85$) con la cantidad relativa de ADN_{ac} total (ng/ml) que estaba presente en la fracción mononucleosómica más corta (Figura 4). Se detectaron ddPCR-LI elevados, inmediatamente (15 min) después del injerto, indicativo de ADN de injerto (*ADN graft*) necrótico que surgió durante la isquemia fría. A las 6 h después del injerto, el ddPCR-LI comenzó a disminuir y alcanzó un mínimo a las 24 h. Este mínimo se explica por el efecto dominante del ADN_{ac}G (ADN acelular de injerto) liberado durante e inmediatamente después de la cirugía, después de 24 h, la mayoría de estos fragmentos se degradan en la fracción mononucleosómica y, por lo tanto, representan el bajo ddPCR-LI (Figura 4).

Para usar el ddPCR-LI para la corrección del rendimiento de θ_{Amp} por PCR de la cuantificación por ddPCR, los perfiles de ADN_{ac} se simularon y el ddPCR-LI se registró en paralelo con el porcentaje amplificable de los amplicones cortos. En la figura 5 se muestra el intervalo de perfiles de ADN_{ac} simulados (A) y la dispersión resultante de los datos (B). El mejor ajuste del índice de L con la θ_{Amp} (fracción amplificable) específica, era un polinomio de segundo orden (Rendimiento = $1,32ddPCR-LI^2 + 0,274ddPCR-LI + 0,515$), que se utilizó para otros cálculos.

La corrección del ddPCR-LI con respecto a la cuantificación absoluta del número de copias, se aplicó a un conjunto de 210 determinaciones de ADN_{ac} de 39 receptores de hígado, en comparación con un valor fijo del 59 % para θ_{Amp} (procedente del LI medio del conjunto de muestras) utilizado en la fórmula anterior. En la figura 5C se muestra el efecto de esa corrección dinámica basada en LI, a partir del cual se puede estimar que el error puede reducirse en un ± 10 % como puede deducirse de las líneas de desviación estándar 1 en el gráfico de diferencia. En la figura 5D se muestra el efecto total de la corrección de la pérdida de molécula controlable en todo el proceso. En promedio, la concentración final de ADN_{ac} después de la corrección, para tanto la extracción como la θ_{Amp} , que puede estar tan cerca de los valores reales como sea posible con esfuerzos razonables, se encuentra que es 2,1 veces (IC 95 %: 1,7 a 3,3) más alta que la de las concentraciones sin procesar dadas con QX100/200.

Por tanto, este ejemplo, ilustra el desarrollo y uso de un ensayo de dos longitudes para la cuantificación mediante PCR

digital. Para la cuantificación, se aplicaron las siguientes etapas de control de errores: La eficiencia de la extracción se controló usando un ADN artificial *spike-in*; El patrón de fragmentación de ADNac se evaluó mediante un ensayo de 2 longitudes (ddPCR-LI) y se utilizó para evaluar la fracción amplificable θ_{Amp} ; la preamplificación se comparó con la PCR directa para evaluar el error intrínseco.

- 5 Los kits de extracción de Roche y Qiagen se realizaron con una recuperación de ADNac de 70-90 %, que se corrigió mediante el ADN *spike in*. En las muestras clínicas se producen diferentes patrones de fragmentación de ADNac, lo que contribuye a una imprecisión de ~20 %, que se elimina mediante la θ_{Amp} obtenida de ddPCR-LI. Las concentraciones de ADNac después de la corrección de estos dos efectos fueron, en promedio, 2,1 veces (1,7 a 3,2)
- 10 más altas que las de los valores sin procesar. La preamplificación duplica la imprecisión de los resultados, el volumen muerto del QX200 (~ 40 %) contribuye a un error total de aproximadamente el 30 %. Los ensayos de ddPCR multiplex para ADNacG sin preamplificación dieron los resultados más fiables y cuantifican restos de ADNac de 0,25 % con una imprecisión de <10 %.
- 15 Este ejemplo demuestra un sistema de ensayo fiable para cuantificar bajas cantidades de ADNac quimérico, con control total del proceso y error aleatorio minimizado. El sesgo de cuantificación se redujo en gran medida teniendo en cuenta las fuentes medibles de inexactitud.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cuantificación de ADNac quimérico en una muestra de un paciente, comprendiendo el método:
 - 5 (a) proporcionar una muestra de ADN acelular (ADNac) de una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un paciente;
 - (b) realizar una PCR digital multiplex que comprende al menos una primera amplificación y una segunda amplificación, en donde la primera amplificación se dirige a un primer locus genómico de una sola copia y da como resultado la producción de un primer amplicón y una segunda amplificación se dirige a un segundo locus genómico de una sola copia y da como resultado la producción de un segundo amplicón, en donde el primer y el segundo amplicón difieren en longitud en al menos 50 pares de bases;
 - 10 (c) determinar la proporción del primer o segundo amplicón en el producto amplificado total a partir de la PCR digital de la etapa (b) para proporcionar un factor de corrección para la fracción amplificable de la muestra de ADNac, y
 - 15 (d) corregir una PCR digital diagnóstica realizada en la muestra de ADNac para evaluar el nivel de ADN quimérico presente en la muestra, utilizando el factor de corrección determinado en la etapa (c).
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (b) comprende además una reacción de amplificación que se dirige al ADN que se añadió a la muestra de sangre, suero o plasma antes de la extracción.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer y el segundo amplicones difieren en longitud en 100 nucleótidos o más.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el más largo del primer y segundo amplicones tiene una longitud de 150 a 400 pares de bases y el más corto del primer y segundo amplicones tiene una longitud de 50 a 150 pares de bases.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la muestra de ADNac es de un paciente trasplantado.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la muestra de ADNac es de un paciente con cáncer.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la muestra de ADNac es de una paciente gestante.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el paciente es un ser humano.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el ADN quimérico es de un donante de trasplante o de un feto.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el ADN quimérico es de células cancerosas.

Figura 1

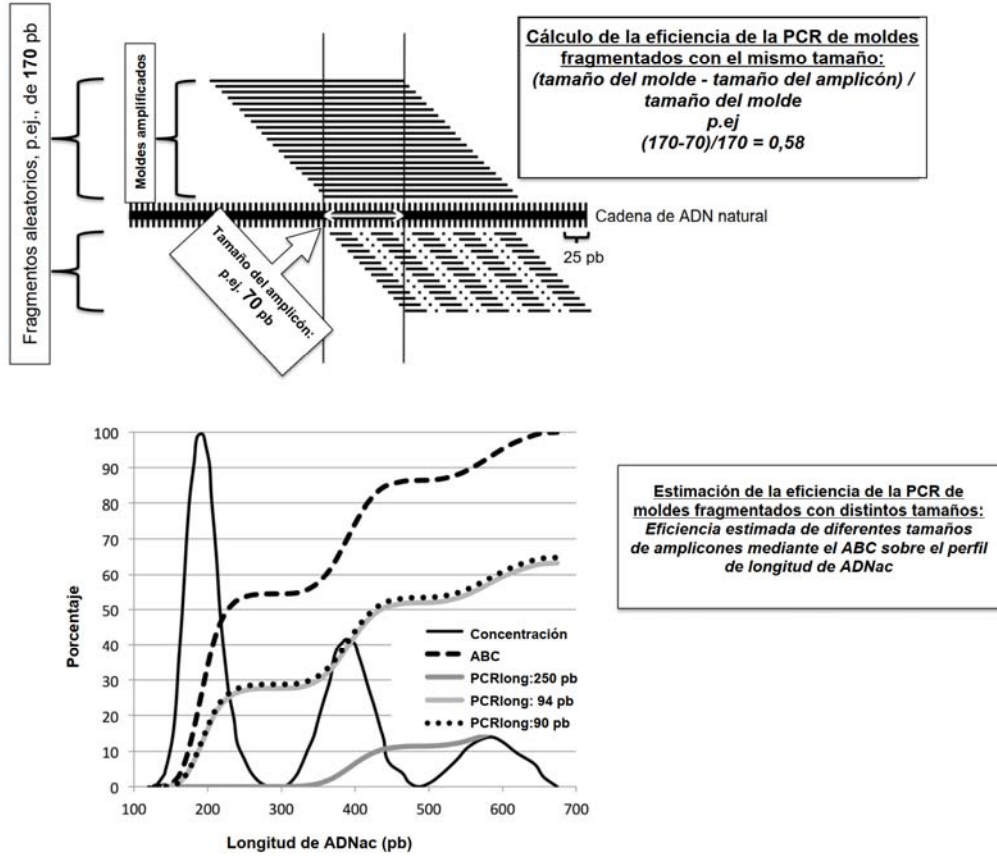


Figura 2

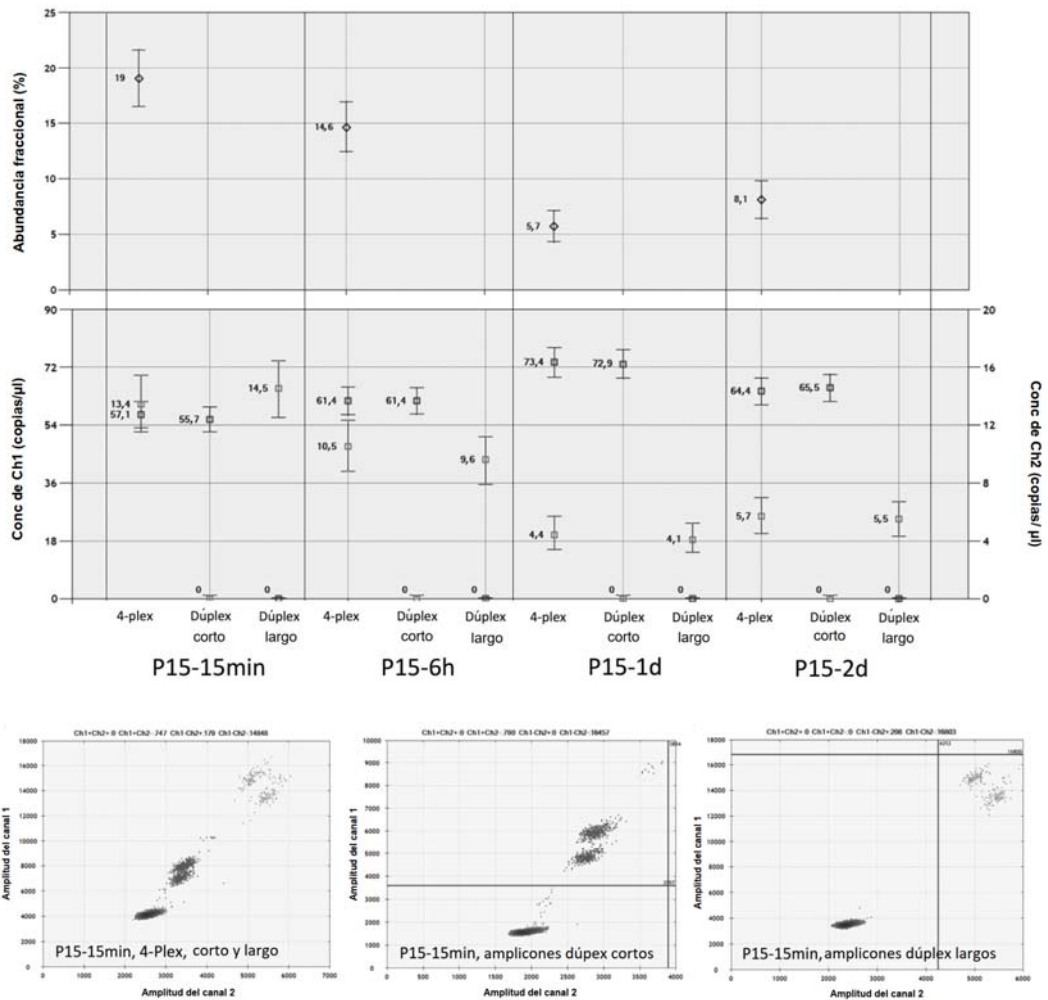


Figura 3

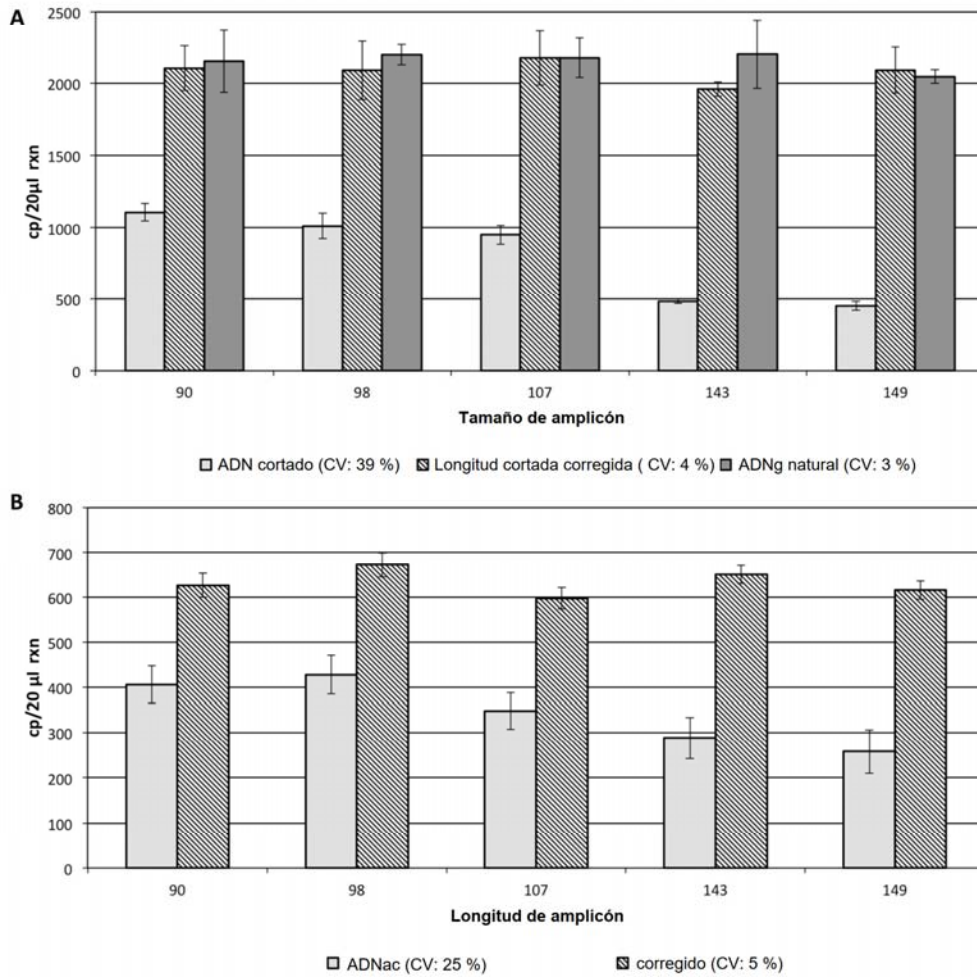


Figura 4

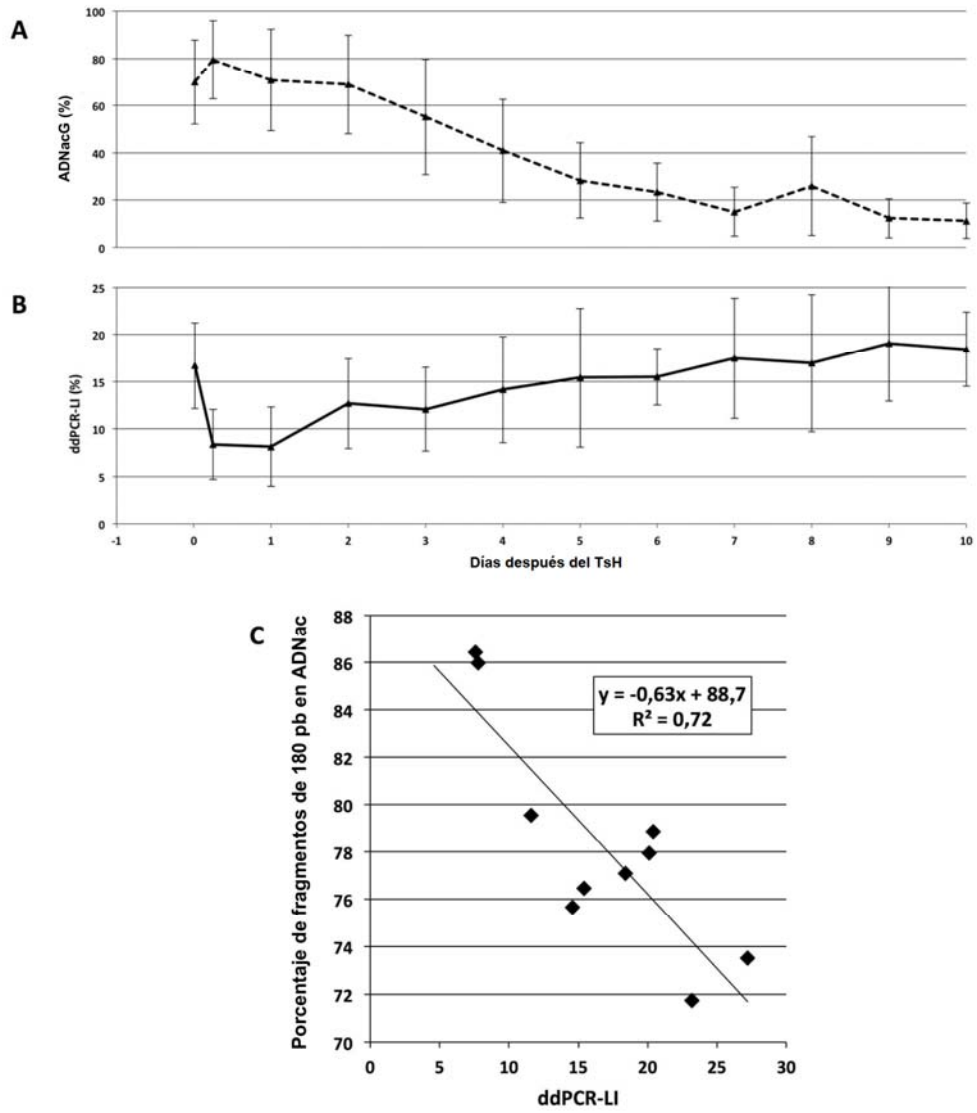


Figura 5

