



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 198 700**

⑤ Int. Cl. 7: **C12Q 1/68**  
**G01N 33/53**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧ Número de solicitud europea: **98910845 .1**

⑧ Fecha de presentación: **04.03.1998**

⑧ Número de presentación de la solicitud: **0994963**

⑧ Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2000**

⑤ Título: **Diagnóstico prenatal no invasivo.**

③ Prioridad: **04.03.1997 GB 9704444**

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2004**

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2004**

⑦ Titular/es: **ISIS INNOVATION LIMITED**  
**Ewert House, Ewert Place**  
**Summertown Oxford OX2 7SG, GB**

⑦ Inventor/es: **Lo, Yuk-Ming, Dennis y**  
**Wainscoat, James, Stephen**

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

**ES 2 198 700 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

Diagnóstico prenatal no invasivo.

5 Esta invención se refiere a métodos de detección prenatal en los que se utilizan técnicas no invasivas. En particular, se refiere a la diagnosis prenatal mediante la detección de ácidos nucleicos fetales en el suero o plasma de una muestra de sangre materna.

10 En los métodos de rastreo prenatal convencionales para detectar anomalías fetales y para la determinación del sexo se utilizan tradicionalmente muestras fetales derivadas de técnicas invasivas tales como la amniocentesis y la toma de muestras del vello coriónico. Estas técnicas requieren una manipulación cuidadosa y presentan un grado de riesgo para la madre y el embarazo.

15 Más recientemente, se han ideado técnicas para predecir las anomalías en el feto y posibles complicaciones en el embarazo, en las que se utilizan muestras de sangre o suero maternas. Entre los tres marcadores comúnmente utilizados se incluyen la alfa-fetoproteína (AFP-de origen fetal), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y el estriol, para rastrear el Síndrome de Down y los defectos del tubo neural. El suero materno también es utilizado en la actualidad para el rastreo bioquímico de aneuploidías cromosómicas y defectos del tubo neural. El paso de células nucleadas entre la madre y el feto es ahora un fenómeno bien reconocido (Lo y col 1.989; Lo y col 1.996). El uso de células fetales en la sangre materna para la diagnosis prenatal no invasiva (Simpson y Elias 1.993) evita los riesgos asociados a las técnicas invasivas convencionales. En WO 91/08304 se describe la determinación genética prenatal utilizando ADN fetal obtenido a partir de células fetales de la sangre materna. Se han realizado considerables avances en el enriquecimiento y aislamiento de células fetales para su análisis (Simpson y Elias 1.993; Cheung y col. 1.996). Sin embargo, estas técnicas llevan mucho tiempo o requieren un equipo costoso.

25 Recientemente, ha habido interés en el uso de ADN derivado de plasma o suero para la diagnosis molecular (Mulcahy y col. 1.996). En particular, se ha demostrado que se puede detectar ADN tumoral por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el plasma o suero de algunos pacientes (Chen y col. 1.996; Nawroz y col. 1.996).

30 En GB 2.299.166 se describe la diagnosis de cáncer no invasiva mediante la detección de las mutaciones del gen K-ras y N-ras utilizando mecanismos basados en la PCR.

35 Se ha descubierto que el ADN fetal es detectable en muestras de suero o plasma maternas. Este es un descubrimiento sorprendente e inesperado; el plasma materno es precisamente el material que es descartado rutinariamente por los investigadores que estudian la diagnosis prenatal no invasiva utilizando las células fetales de la sangre materna. La tasa de detección es muy superior utilizando suero o plasma que utilizando ADN de células sanguíneas nucleadas extraídas de un volumen comparable de sangre completa, sugiriendo que existe un enriquecimiento de ADN fetal en el plasma y el suero maternos. De hecho, se ha medido una concentración de ADN fetal en el plasma materno expresada como un % del ADN total desde el 0,39% (la concentración más baja medida en el inicio del embarazo), hasta tan alta como el 11,4% (al final del embarazo), en comparación con proporciones de generalmente alrededor del 0,001% y hasta sólo el 0,025% para las fracciones celulares (Hamada y col. 1.993). Es importante que el ADN fetal no sea un artefacto del procedimiento de coagulación.

45 La invención proporciona un método de detección realizado sobre una muestra de suero o plasma de ADN materna de una hembra embarazada, cuyo método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de origen fetal en la muestra. La detección puede comprender la cuantificación del ácido nucleico o la determinación de la secuencia del ácido nucleico. La invención proporciona de este modo un método para la diagnosis prenatal.

50 El término "diagnosis prenatal" utilizado aquí abarca la determinación de cualquier estado o característica materna o fetal que esté relacionado con el propio ADN fetal o con la cantidad o calidad del ADN fetal en el suero o plasma materno. Se incluyen la determinación del sexo, y la detección de las anomalías fetales que pueden ser por ejemplo aneuploidías cromosómicas o simples mutaciones. También está incluida la detección y la verificación de los estados asociados con el embarazo tales como la preclampsia que produce cantidades más altas o más bajas que las normales de ADN fetal presente en el suero o plasma materno. El ácido nucleico detectado en el método según la invención puede ser de un tipo distinto al ADN v.g. ARNm.

55 La invención proporciona un método para realizar una diagnosis prenatal sobre una muestra de sangre materna, cuyo método comprende obtener una fracción no celular de la muestra de sangre y realizar un análisis de ácido nucleico de la fracción. Un método de realización de una diagnosis prenatal de una muestra de sangre materna según la invención puede comprender eliminar todas o sustancialmente todas las poblaciones de células nucleadas y anucleadas de la muestra de sangre y someter el fluido restante a una prueba de ácido nucleico fetal indicativo de un estado o característica materna o fetal.

Un método de realización de la diagnosis prenatal, comprende típicamente:

- 65
- (i) proporcionar una muestra de sangre materna;
  - (ii) separar la muestra en una fracción celular y una no celular;

## ES 2 198 700 T3

(iii) detectar la presencia de un ácido nucleico de origen fetal en la fracción no celular utilizando un método de detección de la invención;

(iv) proporcionar una diagnosis basada en la presencia y/o cantidad y/o secuencia del ácido nucleico fetal.

5

La fracción no celular utilizada en la etapa (iii) puede ser una fracción de plasma. En el método se puede incluir adicionalmente la realización de una etapa adicional en la que se permite la coagulación de la sangre materna y se utiliza el suero resultante en la etapa (iii).

10

La muestra de suero o plasma materno deriva de la sangre materna. Se puede utilizar tan poco como 10  $\mu$ l de suero o plasma. Sin embargo puede ser preferible emplear muestras más grandes con el fin de incrementar la precisión. El volumen de muestra requerido puede depender del estado o característica que esté siendo detectado. En cualquier caso, el volumen de sangre materna que se necesita tomar es pequeño.

15

La preparación de suero o plasma a partir de la muestra de sangre materna se lleva a cabo mediante mecanismos normalizados. El suero o plasma es sometido normalmente después a un procedimiento de extracción de ácido nucleico. Entre los métodos adecuados se incluyen los métodos descritos aquí en los ejemplos, y las variaciones de esos métodos. Entre las posibles alternativas se incluyen el método del calentamiento controlado descrito por Frickhofen y Young (1.991). Otro método de extracción de suero y plasma adecuado es el tratamiento con proteinasa K seguido de extracción con fenol/cloroformo. Los métodos de extracción de ácido nucleico de suero y plasma que permiten la purificación de ADN o ARN a partir de volúmenes más grandes de muestra materna aumentan la cantidad de material de ácido nucleico fetal para el análisis y de este modo mejoran la precisión. Un método de enriquecimiento basado en la secuencia también se podría utilizar sobre el suero o plasma materno para enriquecer específicamente en secuencias de ácido nucleico fetal.

20

Se puede llevar a cabo típicamente un método según la invención en el que la muestra de suero o plasma materno contiene ADN fetal a una concentración fraccionada de al menos aproximadamente el 0,14%, tal como al menos el 0,39%, sin someterlo a una etapa de enriquecimiento de ADN fetal.

25

Normalmente se lleva a cabo una amplificación de las secuencias de ADN fetal de la muestra. Se pueden utilizar sistemas de amplificación de ácido nucleico normalizados, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA), los métodos de ADN ramificado, etcétera. Los métodos de amplificación preferidos implican una PCR. Típicamente, en la amplificación se utiliza al menos un cebador oligonucleotídico específico de la secuencia fetal. Generalmente, el ácido nucleico puede ser detectado por medio de una sonda específica de la secuencia.

30

El método según la invención puede ser particularmente útil para la determinación del sexo que se puede llevar a cabo detectando la presencia de un cromosoma Y. El cromosoma Y puede ser detectado detectando la presencia de una secuencia de ácido nucleico fetal del cromosoma Y. La secuencia del cromosoma Y puede ser desde el locus DYS14 o desde el gen SRY. Aquí se demuestra que utilizando sólo 10  $\mu$ l de plasma o de suero se puede lograr una tasa de detección del 80% para el plasma y del 70% para el suero. Se ha demostrado que el uso de menos de 1 ml de plasma o suero materno proporciona una tasa de detección exacta al 100%.

35

También se puede utilizar un método de la invención para detectar la presencia de un ácido nucleico fetal de un cromosoma distinto de Y inhibido por vía paterna. Se puede aplicar un método según la invención a la detección de cualquiera de las secuencias heredadas por vía paterna que no son poseídas por la madre y que pueden ser por ejemplo genes que confieren un fenotipo de una enfermedad en el feto o que puede ser un gen antigénico de la sangre tal como el gen Rhesus D. Entre los ejemplos se incluyen:

40

a) La determinación del status rhesus D fetal en madres rhesus negativas (Lo y col. 1.993). Esto es posible debido a que los individuos rhesus D positivos poseen el gen rhesus D que está ausente en las secuencias del gen rhesus D en el plasma y el suero de los individuos rhesus D negativos. Por lo tanto, la detección de las secuencias del gen rhesus D en el plasma y el suero de una madre rhesus D negativa es indicativa de la presencia de un feto rhesus D positivo. Este enfoque también puede ser aplicado a la detección de ARNm de rhesus D fetal en plasma y suero materno.

45

b) Hemoglobinopatías (Camaschella y col. 1.990). Se sabe que más de 450 mutaciones diferentes en el gen de la beta-globina ocasionan la beta-talasemia. Siempre que el padre y la madre porten mutaciones diferentes, la mutación paterna puede ser utilizada como diana de amplificación del plasma y el suero materno, con el fin de evaluar el riesgo de que el feto pueda ser afectado.

50

c) Polimorfismos o mutaciones del ADN heredados por vía paterna. Los polimorfismos o mutaciones del ADN heredados por vía paterna presentes o bien en un cromosoma Y o bien en uno distinto de Y, pueden ser detectados en el plasma y el suero materno para evaluar el riesgo de que el feto sea afectado por una enfermedad concreta mediante análisis de la conexión. Además, este tipo de análisis también puede ser utilizado para averiguar la presencia de ácido nucleico fetal en una muestra de plasma o suero materno concreta, antes del análisis de diagnóstico tal como la determinación del sexo. Esta aplicación requerirá el genotipaje previo del padre y de la madre utilizando un panel de marcadores polimórficos y después se elegirá un alelo para la detección que esté

55

presente en el padre, pero ausente en la madre.

El método de diagnóstico prenatal no invasivo basado en el plasma o el suero según la invención puede ser aplicado para rastrear el Síndrome de Down y otras aneuploidías cromosómicas. Dos posibles modos en los que esto se podría realizar son los siguientes:

- a) Se ha descubierto que en el embarazo que implica fetos con aneuploidías cromosómicas v.g. el Síndrome de Down, el nivel de células fetales que circulan en la sangre materna es superior al de los embarazos que implican fetos normales (Bianchi y col. 1.996). Tras el sorprendente descubrimiento descrito aquí de que el ADN fetal está presente en el plasma y el suero maternos, también se ha demostrado que el nivel de ADN fetal en el plasma y el suero maternos es superior en los embarazos en los que el feto tiene una aneuploidía cromosómica que en los embarazos normales. La detección cuantitativa del ácido nucleico fetal en el plasma o el suero materno v.g. un análisis de PCR cuantitativo, puede ser utilizada para rastrear aneuploidías cromosómicas en mujeres embarazadas.
- b) Un segundo método implica la cuantificación de marcadores del ADN fetal en diferentes cromosomas. Por ejemplo, para un feto afectado por el Síndrome de Down la cantidad absoluta de ADN derivado del cromosoma 21 fetal siempre será mayor que la de otros cromosomas. El reciente desarrollo de mecanismos de PCR cuantitativos muy exactos, tales como la PCR cuantitativa a tiempo real (Heid y col. 1.996) facilita este tipo de análisis.

Otra aplicación de la cuantificación exacta de los niveles de ácido nucleico fetal en el suero o el plasma materno es la verificación molecular de ciertas patologías placentarias, tales como la pre-eclampsia. La concentración de ADN fetal en el suero y el plasma maternos es elevada en la pre-eclampsia. Esto se debe probablemente a la lesión placentaria que se produce.

Por consiguiente, un método según la invención puede comprender determinar la concentración de una secuencia de ácido nucleico fetal en el suero o plasma materno. La concentración de ácido nucleico puede ser mediante PCR cuantitativa. Tales métodos de la invención pueden ser utilizados para la detección de un estado materno o fetal en el cual el nivel de ADN fetal en el suero o plasma materno es superior o inferior al normal, o en el que el patrón de variación de la concentración de ADN fetal en el suero o plasma materno en fases concretas de la gestación es diferente del normal. Por ejemplo, la pre-eclampsia y la aneuploidía cromosómica fetal pueden ser detectados mediante tales métodos.

Se prevé que será posible incorporar los métodos de diagnóstico basados en ácidos nucleicos descritos aquí a los programas de rastreo prenatal existentes. La determinación del sexo ha sido realizada con éxito en embarazos de 7 a 40 semanas de gestación.

En las Figuras adjuntas:

La Figura 1 muestra el aumento de ADN fetal en embarazos aneuploides en comparación con embarazos de control;

La Figura 2 muestra el incremento de ADN fetal en la pre-eclampsia en comparación con embarazos de control;

La Figura 3 muestra una curva de amplificación y un ciclo umbral para la PCR cuantitativa a tiempo real;

La Figura 4 muestra las concentraciones de ADN fetal en muestras maternas para numerosos sujetos en diferentes etapas de gestación.

Ahora se ilustrará la invención en los siguientes Ejemplos.

## Ejemplos

Ejemplo 1

*Análisis de ADN fetal para la determinación del sexo*

### *Pacientes*

Se reclutaron mujeres embarazadas asistidas en Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecology, John Radcliffe Hospital, Oxford antes de la amniocentesis o el parto. La aprobación ética del proyecto fue obtenida del Central Oxfordshire Research Ethics Committee. En cada caso se solicitó el consentimiento por escrito. Se recogieron 5 a 10 ml de sangre periférica materna en un tubo con EDTA y uno corriente. Para las mujeres que se sometían a amniocentesis, la sangre materna siempre se recogía antes del procedimiento y también se recogían 10 ml de fluido amniótico para la determinación del sexo del feto. Para las mujeres reclutadas justo antes del parto, el sexo del feto se observaba en el momento del parto. Las muestras de sangre de control también fueron obtenidas de 10 sujetos hembra no embarazadas y el tratamiento adicional de las muestras fue como para los especímenes obtenidos de individuos embarazados.

## ES 2 198 700 T3

### *Preparación de la muestra*

Las muestras de sangre materna fueron tratadas entre 1 y 3 horas después de la venesección. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3.000 g y el plasma y el suero fueron cuidadosamente separados de los tubos que contenían EDTA y corrientes, respectivamente, y transferidos a tubos de polipropileno corrientes. Se tuvo mucho cuidado de asegurarse de que la capa cuajada o el coágulo de sangre no se alterara cuando las muestras de plasma o suero, respectivamente, fueran separadas. Tras la separación de las muestras de plasma, se reservaron el sedimento de glóbulos rojos y la capa cuajada para la extracción del ADN utilizando un equipo de extracción de ADN Nucleon (Scotlabs, Strathclyde, Scotland, Reino Unido). Las muestras de plasma y suero fueron sometidas después a una segunda centrifugación a 3.000 g y las muestras de plasma y suero recentrifugadas se recogieron en tubos de polipropileno nuevos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el tratamiento adicional.

### *Extracción de ADN de las muestras de plasma y suero*

Las muestras de plasma y suero fueron tratadas para la PCR utilizando una modificación del método de Emanuel y Pestka (1.993). En resumen, se pusieron 200  $\mu$ l de plasma o suero en un tubo eppendorf de 0,5 ml. La muestra se calentó después a 99°C durante 5 minutos sobre un bloque térmico. La muestra calentada fue centrifugada después a máxima velocidad utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante claro se recogió después y se utilizaron 10  $\mu$ l para la PCR.

### *Extracción de ADN del fluido amniótico*

Las muestras de fluido amniótico fueron tratadas para la PCR utilizando el método de Rebello y col. (1.991). Se transfirieron 100  $\mu$ l de fluido amniótico a un tubo eppendorf de 0,5 ml y se mezclaron con un volumen igual de Chelex-10 al 10% (Bio-Rad). Tras la adición de 20  $\mu$ l de aceite mineral para evitar la evaporación, el tubo se incubó a 56°C durante 30 minutos sobre un bloque térmico. Después, el tubo se sometió a vórtice brevemente y se incubó a 99°C durante 20 minutos. El fluido amniótico tratado se almacenó a 4°C hasta la PCR y se utilizaron 10  $\mu$ l en una reacción de 100  $\mu$ l.

### *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito (Salki y col. 1.988) utilizando reactivos obtenidos de GeneAmp DNA Amplification Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). La detección de la secuencia fetal específica de Y del ADN de plasma, suero y celular materno se llevó a cabo como se describe utilizando cebadores Y1.7 e Y1.8, diseñados para amplificar una secuencia Y de copia única (DYS14) (Lo y col. 1.990). La secuencia de Y1.7 es 5' CAT CCA GAG CGT CCC TGG CTT 3' [SEC ID NUM: 1] y la de Y1.8 es 5' CTT TCC ACA GCC ACA TTT GTC 3' [SEC ID NUM: 2]. El producto específico de Y tenía 198 pb. Se utilizaron sesenta ciclos de Hot Start PCR utilizando la tecnología Ampliwax sobre 10  $\mu$ l de plasma o suero materno o 100 ng de ADN de células sanguíneas nucleadas maternas (etapa de desnaturalización de 94°C 1 minuto y una etapa de re-recocido/prolongación combinada de 57°C 1 minuto). Se utilizaron cuarenta ciclos para la amplificación del fluido amniótico. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Los resultados de la PCR fueron puntuados antes de revelar el sexo del feto al investigador.

### *Resultados*

#### *Sensibilidad del análisis PCR*

Se realizaron diluciones seriadas de ADN genómico masculino en 1  $\mu$ g de ADN genómico femenino y se amplificaron mediante el sistema Y-PCR utilizando 60 ciclos de amplificación. Se detectaron señales positivas hasta la dilución 100.000, es decir, aproximadamente el equivalente de una sola célula masculina.

#### *Amplificación de la secuencia de ADN fetal a partir de plasma y suero maternos*

Se recogieron muestras de plasma y suero maternos de 43 mujeres embarazadas con edades gestacionales entre 12 y 40 semanas. Había 30 fetos varón y 13 fetos hembra. De las 30 mujeres que portaban fetos varón, se detectaron señales Y-positivas en 24 muestras de plasma y 21 muestras de suero, cuando se utilizaban 10  $\mu$ l de las respectivas muestras para la PCR. Cuando se utilizaba ADN de células sanguíneas nucleadas para la Y-PCR, sólo se detectaban señales positivas en 5 de los 30 casos. Ninguna de las 13 mujeres que portaban fetos hembra y ninguno de los 10 controles de hembras no embarazadas daba como resultado una señal Y positiva cuando se amplificaba ADN de plasma, suero o celular. La exactitud de esta técnica, incluso con muestras de suero/plasma sólo de 10  $\mu$ l, es por tanto muy elevada y muy importantemente es suficientemente elevada para resultar útil. Resultará evidente que la exactitud puede ser mejorada hasta el 100% o casi el 100%, por ejemplo utilizando un volumen mayor de suero o plasma.

#### *Ejemplo 2*

#### *Análisis cuantitativo de ADN fetal en suero materno en embarazos aneuploides*

El rastreo y la diagnosis prenatal de aneuploidías cromosómicas fetales es una parte importante del cuidado obs-

## ES 2 198 700 T3

tétrico moderno. Debido a los riesgos asociados a los procedimientos invasivos tales como la amniocentesis y la impracticabilidad de realizar el rastreo con métodos invasivos, se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de métodos de rastreo no invasivos para las aneuploidías cromosómicas fetales. Los dos métodos no invasivos principales que han sido desarrollados son el rastreo bioquímico del suero materno y el examen por ultrasonidos de la translucidez nuchal. Estos métodos están ambos asociados a tasas significativas de falsos positivos y falsos negativos.

La demostración de que las células nucleadas fetales de la circulación materna ofrecen una nueva fuente de material fetal para la diagnosis no invasiva de las aneuploidías cromosómicas fetales (Simpson y col. 1.993). Mediante el uso de protocolos de enriquecimiento de células nucleadas fetales, diversos grupos han informado sobre la detección de células nucleadas fetales aneuploides aisladas de sangre materna (Elias y col. 1.992; Bianchi y col. 1.992). Recientemente, se ha demostrado que existe un incremento del número de células nucleadas fetales en la circulación materna cuando el feto padece una aneuploidía cromosómica (Bianchi y col. 1.997).

### *Muestras de pacientes*

Se recogieron muestras de sangre de mujeres embarazadas sometidas a ensayo prenatal antes de cualquier procedimiento invasivo. El cariotipo fetal fue confirmado mediante análisis citogenético de muestras de fluido amniótico o vello coriónico. La aprobación se obtuvo del Research Ethics Committee of The Chinese University of Hong Kong. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos corrientes. Tras la coagulación sanguínea, las muestras fueron centrifugadas a 3.000 g, y el suero fue separado cuidadosamente y transferido a tubos de polipropileno corrientes. Las muestras fueron almacenadas a -70°C o -20°C hasta el tratamiento adicional.

### *Extracción de ADN de muestras de plasma y suero*

Se extrajeron ADN de muestras de suero utilizando un QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el "protocolo de sangre y fluido corporal" recomendado por el fabricante (Chen y col. 1.996). Se utilizaron 400 a 800 µl de muestra de plasma/suero para la extracción de ADN por columna. La cantidad exacta utilizada fue documentada para permitir el cálculo de la concentración de ADN diana.

### *PCR cuantitativa a tiempo real*

Los aspectos teóricos y prácticos de la PCR cuantitativa a tiempo real habían sido descritos previamente por Heid y col. (1.996). El análisis de PCR cuantitativo a tiempo real se realizó utilizando un PE Applied Biosystems 7700 Sequence Detector (Foster City, CA, USA) que es esencialmente un ciclador térmico/ detector de fluorescencia combinado con la capacidad de verificar el progreso de las reacciones de PCR individuales ópticamente. El sistema de amplificación e información del producto utilizado se basa en el análisis de la 5'-nucleasa (Holland y col. 1.991) (the TaqMan assay comercializado por Perkin-Elmer). En este sistema, aparte de los dos cebadores de amplificación como en la PCR convencional, también se incluye una sonda de hibridación fluorogénica marcada dual (Lee y col. 1.993; Livak y col. 1.995). Un colorante fluorescente sirve como informador (FAM, es decir, 6-carboxifluoresceína) y su espectro de emisión es sofocado por un segundo colorante fluorescente (TAMRA, es decir, 6-carboxi-tetrametilrodamina). Durante la fase de prolongación de la PCR, la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa de Taq escinde el informador de la sonda liberándola de este modo del sofocador, dando como resultado un incremento de la emisión de fluorescencia a 518 nm. El PE Applied Biosystems 7700 Sequence Detector es capaz de medir el espectro fluorescente de los 96 pocillos de la amplificación continuamente durante la amplificación del ADN y los datos son capturados en un ordenador Macintosh (Apple Computer, Cupertino, CA, USA).

El sistema SRY TaqMan constaba de cebadores de amplificación SRY-109F, 5'-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3' [SEC ID NUM: 3]; SRY-245R, 5'-CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3' [SEC ID NUM: 4]; y una sonda TaqMan fluorescente marcada dual SRY-142T, 5'-(FAM)AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA(TAMRA)-3' [SEC ID NUM: 5]. Las combinaciones cebador/sonda fueron diseñadas utilizando el soporte lógico Primer Express (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). Los datos de la secuencia para el gen SRY fueron obtenidos de GenBank Sequence Database (número de acceso L08063).

Las reacciones de amplificación TaqMan fueron ajustadas a un volumen de reacción de 50 µl utilizando los componentes (excepto la sonda TaqMan y los cebadores de amplificación) suministrados en un TaqMan PCR Core Reagent Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). La sonda SRY TaqMan fue sintetizada a la medida por PE Applied Biosystems. Los cebadores de la PCR fueron sintetizados por Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). Cada cebador contenía 5 µl de 10X tampón A, 300 nM de cada uno de los cebadores de amplificación, 100 nM de la sonda SRY TaqMan, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 200 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 400 µM de dUTP, 1,25 unidades de AmpliTaq Gold y 0,5 unidades de uracil-N-glicolsilasa AmpErase. Se utilizaron de 5 a 10 µl del ADN de suero extraído para la amplificación. La cantidad exacta utilizada fue registrada para el posterior cálculo de la concentración. Las amplificaciones del ADN se llevaron a cabo en placas de reacción de 96 pocillos que habían sido congeladas por el fabricante para evitar la reflexión de la luz y se habían cerrado utilizando tapones diseñados para evitar la dispersión de la luz (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). Cada muestra fue analizada por duplicado. Una curva de calibración se creó en paralelo y por duplicado con cada análisis. Se utilizó un factor de conversión de 6,6 pg de ADN por célula para expresar los resultados en forma de números de copias.

El ciclo térmico se inició con una incubación de 2 minutos a 50°C para que actuara la uracil-N-glicolsilasa, seguido

## ES 2 198 700 T3

de una primera etapa de desnaturalización de 10 minutos a 95°C. Después, se llevaron a cabo 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Los datos de amplificación se recogieron por medio de un 7700 Sequence Detector y se almacenaron en el ordenador Macintosh donde fueron analizados utilizando el soporte lógico Sequence Detection System (SDS) desarrollado por PE Applied Biosystems. Se utilizó la cantidad media de cada duplicado para el cálculo de la concentración adicional. La concentración expresada en copias/ml fue calculada utilizando la siguiente ecuación.

$$C = Q \times \frac{V_{ADN}}{V_{PCR}} \times \frac{1}{V_{ext}}$$

donde

C = concentración diana en plasma o suero (copias/ml);

Q = cantidad diana (copias) determinada mediante el detector de secuencia en una PCR;

$V_{ADN}$  = volumen total de ADN obtenido tras la extracción, típicamente 50  $\mu$ l por extracción Qiagen;

$V_{PCR}$  = volumen de solución de ADN utilizada para la PCR, típicamente 5-10  $\mu$ l

$V_{ext}$  = volumen de plasma/suero extraído, típicamente 400-800  $\mu$ l

### *Medidas anticontaminación*

Se utilizaron precauciones estrictas contra la contaminación de la PCR (Kwok y col. 1.989). Se utilizaron puntas de pipeta resistentes al aerosol para la manipulación de todos líquidos. Se utilizaron áreas separadas para ajustar las reacciones de amplificación, la adición del molde de ADN y la realización de las reacciones de amplificación. El 7700 Sequence Detector ofrecía un nivel extra de protección ya que su sistema de detección óptica obviaba la necesidad de reabrir los tubos de reacción después de completarse las reacciones de amplificación, minimizando de este modo la posibilidad de contaminación remanente. Además, el análisis TaqMan también incluía un nivel adicional de medida anti-contaminación en forma de tratamiento de pre-amplificación utilizando uracil-N-glicosilasa que destruía los productos de la PCR que contenían uracilo (Longo y col. 1.990). En cada análisis se incluían múltiples blancos negativos de agua.

### *Resultados*

#### *Desarrollo de PCR cuantitativa a tiempo real*

Para determinar el intervalo dinámico de la PCR cuantitativa a tiempo real, se realizaron diluciones seriadas de ADN de varón en agua que constaba del equivalente de ADN de 1.000 células a 1 célula y se sometió a análisis mediante el sistema SRY TaqMan. A menor número de moléculas diana, más ciclos de amplificación se necesitaban para producir una cierta cantidad de moléculas informadoras. El sistema era suficientemente sensible para detectar el equivalente de ADN de una única célula diana.

Se podía definir un parámetro, denominado ciclo umbral ( $C_T$ ) que se ajustaba a 10 desviaciones típicas por encima de la fluorescencia de la línea base media calculada a partir de los ciclos 1 a 15 y era proporcional al número de copias diana de partida utilizado para la amplificación (Heid y col. 1.996). Una gráfica del ciclo umbral ( $C_T$ ) frente a la cantidad diana de entrada, trazada la última a una escala logarítmica corriente, demostraba el gran intervalo dinámico y la exactitud de la PCR cuantitativa a tiempo real.

El sistema SRY cuantitativo a tiempo real era insensible a la existencia de ADN de hembra de fondo de 0 a 12,800 equivalentes de genoma de hembra. Esto simplificaba enormemente la aplicación de este sistema ya que no tenían que ser construidas curvas de calibración separadas para los diferentes casos debido a la presencia de concentraciones diferentes de ADN fetal y materno.

#### *Análisis cuantitativo del gen SRY fetal de suero materno de embarazos aneuploides y de control*

Se llevo a cabo la PCR de SRY cuantitativa a tiempo real para el ADN de suero extraído de mujeres que portan fetos aneuploides y normales. Los datos de los casos individuales se trazan en la Figura 1. La concentración de ADN fetal era superior en los embarazos aneuploides que en los de control (Mann-Whitney U Test,  $p=0,006$ ).

### *Discusión*

En este estudio los autores de la presente invención demuestran que la concentración de ADN fetal en el suero materno es elevada en embarazos aneuploides. Estos resultados indican que la cuantificación del ADN fetal tiene el potencial de ser utilizada como nuevo marcador de rastreo para las aneuploidías cromosómicas fetales. Se pudo llevar a cabo un estudio basado en una población a gran escala para desarrollar valores de corte para el rastreo. También sería

## ES 2 198 700 T3

útil investigar la correlación de la concentración de ADN fetal con los otros marcadores bioquímicos para el rastreo bioquímico del suero materno.

5 El mecanismo o los mecanismos por los cuales se libera más cantidad de ADN fetal a la circulación materna en los embarazos aneuploides requiere una investigación adicional. Una posibilidad está relacionada con el incremento del número de células nucleadas fetales que se liberan a la sangre materna en los embarazos aneuploides (Bianchi y col. 1.997). Otro posible mecanismo puede ser el incremento de muerte celular o recambio que puede estar asociado con las aneuploidías cromosómicas.

### 10 Ejemplo 3

#### *Determinación prenatal no invasiva del status RhD fetal de plasma de mujeres embarazadas RhD negativas*

##### *Introducción*

15 El sistema del grupo sanguíneo rhesus es importante en la transfusión y en la medicina clínica, estando implicado en la enfermedad hemolítica del recién nacido, las reacciones a las transfusiones y la anemia hemolítica autoinmune. A pesar del amplio uso de la profilaxis con inmunoglobulina de rhesus en madres rhesus D (RhD)-negativas, todavía se produce la isoimmunización rhesus. En aquellos casos en los que el padre es heterocigoto para el gen RhD, existe una posibilidad del 50% de que el feto sea RhD positivo y una posibilidad del 50% de que el feto sea RhD-negativo. La determinación prenatal del status RhD fetal en estos casos es clínicamente útil debido a que no son necesarios ensayos invasivos prenatales o maniobras terapéuticas adicionales si se puede demostrar que el feto es RhD negativo.

20 Los avances hacia este objetivo se han hecho posibles recientemente por medio de la clonación del gen RhD humano (Le Van Kim y col. 1.992) y la demostración de que los individuos RhD negativos carecen del gen RhD (Colin y col. 1.991). La determinación prenatal del status RhD fetal se ha realizado utilizando técnicas basadas en la PCR de muestras de fluido amniótico (Bennet y col. 1.993).

30 Numerosos grupos también han investigado la posibilidad de utilizar células fetales de la sangre materna para la determinación del status RhD fetal (Lo y col. 1.993). El problema principal con este enfoque es que el sistema no es suficientemente fiable sin el enriquecimiento en células fetales o el procedimiento de aislamiento como se demuestra mediante las elevadas tasas de falsos positivos y falsos negativos en muestras enriquecidas. El enriquecimiento en células fetales o los procedimientos de aislamiento, por otra parte, son tediosos y costosos de realizar (Geifman-Holtzman y col. 1.996; Sezikawa y col. 1.996).

35 El descubrimiento de los autores de la presente invención de la presencia de ADN fetal en plasma y suero maternos ofrece un nuevo enfoque para la diagnosis prenatal no invasiva.

##### *Materiales y métodos*

###### *Pacientes*

40 Se reclutaron mujeres embarazadas asistidas en Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecology con el consentimiento por escrito. La aprobación del proyecto fue obtenida del Central Oxfordshire Research Ethics Committee. Se reclutaron mujeres en el segundo trimestre de embarazo justo antes de la amniocentesis. Las muestras de sangre se recogieron antes de cualquier procedimiento invasivo. Asimismo se recogieron 10 ml de fluido amniótico para el genotipaje del RhD fetal. Se reclutaron mujeres en el tercer trimestre de embarazo justo antes del parto. Tras el parto se tomó una muestra de sangre del ombligo para la comprobación del status RhD fetal mediante métodos serológicos.

###### *Preparación de la muestra*

50 Se recogieron muestras de sangre en tubos que contenían EDTA. Las muestras fueron centrifugadas a 3.000 g, y el plasma fue cuidadosamente separado en tubos de polipropileno corrientes. Se tuvo un gran cuidado para asegurarse de no alterar la capa cuajada. Las muestras de capa cuajada se almacenaron a -20°C hasta el tratamiento adicional. Las muestras de plasma fueron recentrifugadas después a 3.000 g y de nuevo se separó el plasma cuidadosamente y se transfirió a un grupo nuevo de tubos de polipropileno corrientes. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el tratamiento adicional.

###### *Extracción de ADN de muestras de plasma y suero*

60 Los ADN de las muestras de plasma y de la capa cuajada se extrajeron utilizando un QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el "protocolo de sangre y fluido corporal" recomendado por el fabricante (Cher y col. 1.996). Se utilizaron 800  $\mu$ l de muestra de plasma y 200  $\mu$ l de muestra de capa cuajada para la extracción de ADN por columna.

65

## ES 2 198 700 T3

### *PCR cuantitativa a tiempo real*

El análisis de PCR cuantitativo a tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 2 con las siguientes modificaciones.

5

El sistema RhD TaqMan constaba de los cebadores de amplificación RD-A: 5'-CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT-3' [SEC ID NUM: 6]; RD-B: 5'-AGT GCC TGC GCG AAC ATT-3' [SEC ID NUM: 7]; y una sonda TaqMan fluorescente marcada dual RD-T, 5'-(FAM)TAC GTG AGA AAC GCT CAT GAC AGC AAA GTC T(TAMRA)-3' [SEC ID NUM: 8]. Se diseñaron combinaciones cebador/sonda utilizando el software Primer Express (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). Los datos de la secuencia para el gen RhD fueron los descritos previamente (Le Van Kim y col. 1.992).

10

El sistema beta-globina TaqMan constaba de los cebadores de amplificación beta-globina-354F, 5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3' [SEC ID NUM: 9]; beta-globina-455R, 5'-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3'; y una sonda TaqMan fluorescente marcada dual beta-globina-402T, 5'-(FAM)AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG(TAMRA)-3' [SEC ID NUM: 10]. Se diseñaron combinaciones cebador/sonda utilizando el software Primer Express (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). Los datos de la secuencia fueron obtenidos de GenBank Sequence Database; número de acceso U01317.

15

### 20 *Resultados*

#### *Desarrollo de la PCR TaqMan a tiempo real*

El detector de secuencia a tiempo real es capaz de medir la intensidad de la fluorescencia de las moléculas informadoras liberadas ciclo tras ciclo. Se podía definir un parámetro, denominado ciclo umbral ( $C_T$ ) que se ajustaba a 10 desviaciones típicas por encima de la fluorescencia de la línea base calculada desde los ciclos 1 a 15 (Heid y col. 1.996). Una reacción de amplificación en la cual la intensidad de fluorescencia asciende por encima del umbral durante el curso del ciclo térmico se define como una reacción positiva.

25

Para determinar la sensibilidad de la PCR TaqMan, se realizaron diluciones seriadas del ADN genómico aislado de un individuo RhD positivo en agua que constaba del ADN equivalente de 1.000 células a 1 célula y se sometieron a análisis mediante el sistema SRY TaqMan. A menor número de moléculas diana, más ciclos de amplificación se necesitaban para producir una cierta cantidad de moléculas informadoras. El sistema era suficientemente sensible para detectar el equivalente de ADN de una única célula diana.

30

35

#### *Correlación de la serología y el genotipaje de las mujeres RhD negativas*

Las 21 mujeres embarazadas enroladas en este estudio eran todas serológicamente RhD negativas. El ADN genómico aislado (10 ng) de la capa cuajada de cada mujer fue sometido al análisis RhD TaqMan y en cada caso se encontró un resultado negativo; demostrando de este modo la completa correlación entre la serología y el genotipaje.

40

#### *Genotipaje RhD de ADN aislado de plasma materno*

Se sometieron los ADN extraídos del plasma de las 21 mujeres embarazadas RhD negativas al análisis RhD TaqMan. Había una correlación completa entre el genotipo del RhD fetal pronosticado a partir del análisis del plasma materno y el resultado obtenido del genotipaje del fluido amniótico y el ensayo serológico de la sangre del cordón (Tabla 1).

45

Como control de la susceptibilidad de amplificación del ADN extraído del plasma materno, estos ejemplos también fueron sometidos al análisis de la beta-globina TaqMan. En cada caso, se generaba una señal TaqMan positiva.

50

### *Discusión*

En este estudio los autores de la presente invención han demostrado la viabilidad de realizar el genotipaje RhD fetal no invasivo del plasma materno. Esto representa la primera descripción de la diagnosis de un único gen del plasma materno. Los resultados de los autores de la presente invención indican que esta forma de genotipaje es muy exacta y puede ser utilizada potencialmente para la diagnosis clínica. Esta elevada exactitud es probablemente el resultado de la elevada concentración de ADN fetal en el plasma materno.

55

La familia de polipéptidos rhesus está codificada por dos genes relacionados: el gen CcEe y el gen RhD (Le Van Kim y col. 1.992; Chérif-Zahar y col. 1.990). Debido a la complejidad de los sistemas genéticos Rh, se han descrito numerosos grupos de cebadores para el genotipaje de RhD (Bennet y col. 1.993; Lo y col. 1.993; Aubin y col. 1.997). Con el fin de asegurar la exactitud del sistema de genotipaje de los autores de la presente invención en las muestras en estudio, los autores realizaron un genotipaje de control del ADN de la capa cuajada de su población de pacientes. En todos los casos había una correlación completa entre la serología y el genotipo. Es probable que para una diagnosis clínica robusta, se prefieran grupos de múltiples cebadores. La química TaqMan puede dar cabida fácilmente a la inclusión de múltiples grupos cebador/sonda.

65

## ES 2 198 700 T3

La correlación entre la gravedad de la enfermedad hemolítica fetal y el nivel D materno es un área que requiere una investigación adicional. Es posible que la cantidad de ADN fetal incrementada sea liberada a la circulación materna en presencia de una hemólisis fetal incrementada.

5

TABLA 1

*Genotipaje RhDd de plasma de mujeres embarazadas RhD negativas*

10

Caso	Genotipo RhD Fetal	RhD de Plasma Materno Señal TaqMan
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	+	+
5	+	+
6	-	-
7	-	-
8	+	+
9	+	+
10	-	-
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	-	-
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+

25

30

35

40

45

50

55

### Ejemplo 4

*Elevación de la concentración de ADN fetal en suero materno en embarazos pre-eclámpicos*

60

#### *Introducción*

65

La pre-eclampsia es una causa importante de mortalidad y morbilidad materna y fetal. A pesar de la gran cantidad de investigación, la patogénesis de esta afección todavía no está clara. La alteración se reconoce principalmente por la concurrencia de cambios inducidos por el embarazo que revierten tras el parto, de los cuales la hipertensión y la proteinuria son los criterios clínicos más comúnmente utilizados. Algunos investigadores han sugerido que la pre-eclampsia es el resultado de la implantación trofoblástica anómala, probablemente mediada por mecanismos inmunológicos. Otros investigadores han encontrado cambios patológicos en las arterias espirales en la decidua y el miometrio

en los que la oclusión parcial por material fibrinoide es una característica.

En este Ejemplo los autores de la presente invención utilizan el análisis de PCR cuantitativo a tiempo real para mostrar la concentración de ADN fetal en el suero de mujeres que padecen pre-eclampsia. Las secuencias cromosómicas Y de fetos varones fueron utilizadas como marcador fetal.

### *Materiales y métodos*

#### *Pacientes*

Se reclutaron mujeres embarazadas asistidas en el Department of Obstetrics & Gynaecology en el Prince of Wales Hospital, Shatin, Hong Kong y el Nuffield Department of Obstetrics & Gynaecology, Oxford, Reino Unido con el consentimiento por escrito. La aprobación fue obtenida del Research Ethics Committee de la Chinese University of Hong Kong y el Central Oxfordshire Research Ethics Committee. La pre-eclampsia se definía como una elevación sostenida de la presión sanguínea sistólica hasta 90 mmHg o más alta desde valores previamente más bajos, con una nueva y sostenida proteinuria en ausencia de infección del tracto urinario. Las mujeres embarazadas de control no estaban medicadas y no tenían hipertensión o proteinuria (definida como más de un vestigio en el urianálisis con varilla). Los sujetos pre-eclámpicos y de control fueron emparejados por la edad gestacional.

#### *Preparación de la muestra*

Se recogieron muestras de sangre en tubos corrientes. Tras la coagulación de la sangre, las muestras fueron centrifugadas a 3.000 g, y los sueros fueron separados cuidadosamente y transferidos a tubos de polipropileno corrientes. Las muestras fueron almacenadas a -70°C o a -20°C hasta su tratamiento adicional.

#### *Extracción de ADN de las muestras de plasma y suero*

Los ADN de las muestras de suero fueron extraídos utilizando un QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) utilizando el "protocolo sangre y fluido corporal" recomendado por el fabricante (Chen y col. 1.996). Se utilizaron 400 a 800  $\mu$ l de la muestra de plasma/suero para la extracción del ADN por columna. La cantidad exacta utilizada fue documentada para permitir el cálculo de la concentración de ADN diana.

#### *PCR cuantitativa a tiempo real*

El análisis de PCR cuantitativo a tiempo real se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 2.

### *Resultados*

#### *Análisis cuantitativo del gen SRY fetal de suero materno*

Se llevó a cabo la PCR de SRY cuantitativa a tiempo real para el ADN de suero extraído de las pacientes pre-eclámpicas y de control. Los datos de los casos individuales se trazan en la Figura 2. Las concentraciones de ADN fetal medias en los embarazos pre-eclámpicos y de control eran 381 copias/ml y 76 copias/ml, respectivamente. La concentración de ADN fetal era superior en los embarazos pre-eclámpicos que en los de control (Mann-Whitney U Test,  $p < 0,0001$ ).

### *Discusión*

Los datos de los autores de la presente invención indican que la concentración de ADN fetal es superior en los embarazos pre-eclámpicos en comparación con los no pre-eclámpicos. Estos resultados indican que la medida de la concentración del ADN fetal en el plasma materno puede ser utilizada como un nuevo marcador de la pre-eclampsia. En comparación con otros marcadores de la pre-eclampsia, la medida del ADN fetal es única ya que es un marcador genético mientras otros marcadores, tales como la activina A y la inhibina A, son generalmente marcadores hormonales. Por su naturaleza, un test basado en un marcador genético tiene la ventaja de que es completamente específico para el feto.

Se requerirá investigación adicional para investigar si el nivel de ADN fetal está relacionado con la gravedad de la pre-eclampsia. El descubrimiento de los autores de la presente invención también abre la investigación a la potencial aplicación de la cuantificación del ADN fetal para predecir la existencia de pre-eclampsia, antes del desarrollo de los signos clínicos tales como la hipertensión y la proteinuria.

El mecanismo por el cual se liberan cantidades incrementadas de ADN fetal a la circulación de mujeres pre-eclámpicas no está claro en la actualidad. Entre los posibles mecanismos se incluyen la lesión de la interfase placentaria dando como resultado la muerte de células fetales y la posterior liberación del ADN fetal a la circulación materna. Un segundo mecanismo se debe al incremento del tráfico de células fetales en la circulación materna en la pre-eclampsia. Después el ADN fetal es liberado siguiendo su destrucción en la circulación materna. Serían necesarios estudios futuros que correlacionen los niveles de células fetales y ADN fetal para dirigir estas cuestiones.

## Ejemplo 5

*Análisis cuantitativo de ADN fetal en plasma y suero materno*5 *Introducción*

Los autores de la presente invención han demostrado que el ADN fetal está presente en el plasma y el suero maternos. La detección de las secuencias del ADN fetal era posible en un 80% y un 70% de los casos utilizando sólo 10  $\mu$ l de plasma y suero hervidos, respectivamente (Lo y col. 1.997).

10 Estas observaciones indican que el ADN de plasma/suero materno puede ser una fuente útil de material para la diagnosis prenatal no invasiva de ciertas alteraciones genéticas. Para demostrar que las aplicaciones clínicas son posibles, es necesario responder a importantes preguntas. Primero, se necesita haber demostrado que el ADN fetal del plasma y el suero maternos esta presente en cantidades suficientes para que se pueda llevar a cabo una diagnosis molecular fiable. Segundo, se requieren los datos sobre la variación del ADN fetal en el plasma y el suero maternos con respecto a la edad de gestación para determinar la aplicabilidad de esta tecnología a la diagnosis prenatal temprana.

En este Ejemplo los autores de la presente invención han dirigido ambas cuestiones desarrollando un análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) TaqMan cuantitativo a tiempo real (Heid y col. 1.996) para medir los números de copias de moléculas de ADN fetal en plasma y suero maternos. La técnica permite la verificación óptica continua del progreso de una reacción de amplificación, dando una cuantificación exacta de la diana a lo largo de un amplio intervalo de concentración. Los datos de los autores de la presente invención muestran que el ADN fetal está presente en el plasma y el suero maternos a concentraciones similares a las logradas por muchos protocolos de enriquecimiento de células fetales. Los autores de la presente invención también investigaron los cambios de concentración de ADN fetal a las diferentes edades gestacionales. Utilizando este enfoque basado en el plasma o el suero, demostraron que se puede conseguir la detección fiable del ADN fetal y por lo tanto es útil para la diagnosis prenatal no invasiva de alteraciones genéticas seleccionadas.

*Sujetos y métodos*30 *Pacientes*

Se reclutaron mujeres embarazadas asistidas en el Department of Obstetrics & Gynaecology en el Prince of Wales Hospital, Shatin, Hong Kong con el consentimiento por escrito. La aprobación fue obtenida del Research Ethics Committee de la Chinese University de Hong Kong. Para las mujeres estudiadas en un sólo momento puntual, se obtuvieron muestras de embarazo temprano antes de la amniocentesis o la toma de muestras del vello coriónico mientras las muestras de embarazo avanzado fueron recogidas justo antes del parto. Se recogieron de 5 a 10 ml de sangre periférica materna en un tubo conteniendo EDTA y un tubo corriente. Los sujetos estudiados en múltiples momentos puntuales fueron reclutados del programa de fertilización *in vitro*, antes de la concepción. Se recogieron de 40 5 a 10 ml de sangre materna de estos sujetos en un tubo corriente en cada momento puntual estudiado. Para las mujeres que sufrían diagnosis prenatal, se averiguó el sexo del bebé a partir de los resultados citogenéticos de la amniocentesis o las muestras del vello coriónico. Para las mujeres reclutadas justo antes del parto o del programa de fertilización *in vitro*, se anotó el sexo fetal en el momento del parto.

45 *Preparación de la muestra*

Se centrifugaron muestras de sangre a 3.000 g, y se separaron cuidadosamente plasma y suero de los tubos que contenían EDTA y corrientes, respectivamente, y se transfirieron a tubos de polipropileno corrientes. Se tuvo gran cuidado de asegurar que la capa cuajada o el coágulo de sangre no se alteraran cuando se separaban las muestras de plasma o suero, respectivamente. Las muestras de plasma y suero se recentrifugaron a 3.000 g y los sobrenadantes se recogieron en tubos de polipropileno nuevos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su tratamiento adicional.

*Extracción de ADN de las muestras de plasma y suero*

55 Se extrajeron los ADN de las muestras de plasma y suero utilizando un QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) utilizando el "protocolo de sangre y fluido corporal" recomendado por el fabricante (Chen y col. 1.996). Se utilizaron de 400 a 800  $\mu$ l de muestra de plasma/suero para la extracción del ADN por columna. La cantidad exacta utilizada fue documentada para permitir el cálculo de la concentración de ADN diana.

60 *PCR cuantitativa a tiempo real*

El análisis de PCR cuantitativa a tiempo real se realizó como se describe en el Ejemplo 2, utilizando el sistema SRY TaqMan y el sistema beta-globina TaqMan. El ciclo térmico se inició con una incubación de 2 minutos a 50°C para que actuara la uracil-N-glicosilasa, seguido de una primera etapa de desnaturalización de 10 minutos a 95°C. Después, se llevaron a cabo 4 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

*Resultados**Desarrollo de la PCR cuantitativa a tiempo real*

5 Para determinar el intervalo dinámico de la PCR cuantitativa a tiempo real, se realizaron diluciones seriadas de ADN de varón en agua constando del equivalente de ADN de 1.000 células a 1 célula y se sometieron a análisis por medio del sistema SRY TaqMan. En la Fig. 3a se demuestra que la curva de amplificación se desplazaba hacia la derecha a medida que se reducía la cantidad de diana de entrada. Esto se esperaba ya que las reacciones con menos moléculas diana requerían más ciclos de amplificación para producir una cierta cantidad de moléculas informadoras que las reacciones con más moléculas diana. El sistema era suficientemente sensible para detectar el equivalente de ADN de una única célula diana.

15 En la Fig. 3B se muestra un gráfico del ciclo umbral ( $C_T$ ) frente a la cantidad de diana de entrada, trazada la última en una escala logarítmica creciente. El  $C_T$  se ajustó a 10 desviaciones típicas por encima de la fluorescencia de la línea base media calculada a partir de los ciclos 1 a 15 y era proporcional al número de copias de la diana de partida utilizado para la amplificación (Heid y col. 1.996). La linealidad del gráfico demuestra el gran intervalo dinámico y la exactitud de la PCR cuantitativa a tiempo real. Se obtuvieron resultados similares utilizando el sistema beta-globina TaqMan (resultados no mostrados).

20 El sistema SRY cuantitativo a tiempo real era insensible a la existencia de ADN de hembra de fondo de 0 a 12.800 equivalentes de genoma femenino. Esto simplificaba enormemente la aplicación de este sistema ya que en este intervalo, no se tenían que construir curvas de calibración separadas para los diferentes casos debido a la presencia de diferentes concentraciones de ADN fetal y materno.

25 La posibilidad de reproducir la extracción de ADN del plasma y el suero utilizando el protocolo Qiagen se sometió a ensayo realizando repetidas extracciones (10 para cada caso) de muestras de plasma y suero de individuos normales. Estas extracciones repetidas fueron sometidas después a PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el sistema de la beta-globina. El coeficiente de variación (CV) los valor  $C_T$  de estas extracciones repetidas era del 1,1%.

30 *Análisis cuantitativo utilizando el sistema TaqMan de la beta-globina a tiempo real*

35 La concentración de secuencias de beta-globina en las muestras de plasma y suero materno fueron utilizadas como medida de la cantidad total de ADN extraído, es decir, se analizó el ADN materno y fetal extraído de las muestras de plasma y suero de 50 mujeres embarazadas utilizando el sistema beta-globina TaqMan. Se reclutaron 25 casos durante los trimestres primero y segundo (edad gestacional: 11 a 17 semanas) y se indicaron como muestras de embarazo temprano en la Tabla 2. Los otros veinticinco casos fueron resultados justo antes del parto (edad gestacional: 37 a 43 semanas) y se indicaron como muestras de embarazo tardío en la Tabla 1. Las concentraciones de secuencias de beta-globina en el suero y el plasma maternos se enumeran en la tabla 2. Estos resultados muestran que el suero contiene más ADN que el plasma (Wilcoxon Signed Rank Test,  $p < 0,0005$ ), con una concentración media de ADN en suero 14,6 veces la del ADN en plasma en la población estudiada por los autores de la presente invención. La concentración de secuencias de beta-globina en el plasma materno de las muestras de embarazo temprano y tardío se comparan en la Tabla 2. Estos datos muestran que la cantidad total del ADN en plasma aumenta a medida que progresa el embarazo (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,0005$ ).

45 *Análisis cuantitativo del gen SRY fetal de plasma y suero materno*

50 Se llevó a cabo el análisis cuantitativo a tiempo real utilizando el sistema SRY TaqMan del ADN extraído de plasma y suero materno para determinar la cantidad de ADN fetal. De las 25 muestras de embarazo temprano (edad gestacional: 11 a 17 semanas), 13 eran de mujeres que portaban fetos varones y 12 de mujeres que portaban fetos hembra. De las 25 muestras de embarazo tardío (edad gestacional: 37 a 43 semanas), 14 eran de mujeres que portaban fetos varones y 11 eran de mujeres que portaban fetos hembra. Se obtuvo una señal positiva en cada una de las 27 mujeres que portaban fetos varones y no se detectó señal en ninguna de las 23 mujeres que portaban fetos hembra. Catorce mujeres tenían una historia de alumbramiento de un bebé varón anterior y 5 de éstas llevaban un bebé hembra en el embarazo estudiado en la actualidad.

55 Los datos de SRY cuantitativo de las 27 mujeres que portaban fetos varones se resumen en la Tabla 3. Estos datos muestran que las concentraciones de ADN fetal en plasma y suero son superiores en la gestación tardía que en la gestación temprana (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,0005$ ). Las concentraciones medias del ADN fetal en plasma y suero maternos son 11,5 veces y 11,9 veces, respectivamente, más altas en la gestación tardía en comparación con la gestación temprana. Las concentraciones absolutas de ADN fetal en plasma y suero maternos eran similares en casos individuales. La concentración fraccionada de ADN fetal en el embarazo temprano oscila del 0,39% al 11,9% (media: 3,4%) en plasma y del 0,014% al 0,54% (media: 0,13%) en suero. En el embarazo tardío, la fracción de ADN fetal oscila del 2,33% al 11,4% (media: 6,2%) en plasma y del 0,032% al 3,97% (media: 1,0%) en suero.

65 *Seguimiento sucesivo de mujeres que concibieron mediante fertilización *in vitro**

Se realizó el seguimiento de 20 mujeres que concibieron mediante fertilización *in vitro* (IVF) antes de la concepción y en múltiples momentos puntuales durante el embarazo. Los 20 sujetos tenían embarazos únicos determinados

mediante barrido con ultrasonidos. Doce mujeres dieron a luz bebés varones y las 8 restantes dieron a luz bebés hembra. Ninguna de las mujeres que portaban fetos varones tenía una historia de complicaciones asociadas al embarazo. El sujeto S-51 (fig. 4) se sometió a muestreo del vello coriónico a las 12 semanas. Los sujetos S-1 y S-56 (fig. 4) tuvieron amniocentesis a las 16 y 17 semanas, respectivamente. Un total de 163 muestras de suero de estas 20 mujeres fueron analizadas utilizando el sistema SRY TaqMan cuantitativo a tiempo real. Ninguna de las 65 muestras de suero de las 8 mujeres que portaban bebés hembra daba una señal SRY positiva. La concentración de ADN fetal en las 98 muestras de suero de las mujeres que portaban bebés varones se trazan en la fig. 4.

### Discusión

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema de PCR cuantitativo a tiempo real exacto para determinar la concentración de ADN fetal en plasma y suero materno. Este sistema tiene numerosas ventajas: (1) un gran intervalo dinámico de más de 5 órdenes de magnitud (Heid y col. 1.996); (2) un elevado rendimiento total y un rápido tiempo de cambio total - 96 muestras podían ser amplificadas simultáneamente y cuantificadas en aproximadamente 2 horas; y (3) el uso de un sistema de amplificación homogéneo que no requiere un tratamiento post-PCR y por lo tanto minimiza el riesgo de contaminación remanente.

La observación más importante en este estudio es la muy elevada concentración de ADN fetal en el plasma y el suero maternos. Bianchi y col. informaron que el número medio de células fetales en la sangre materna en embarazos normales era de 19 en 16 ml de sangre materna, es decir, 1,2 células/ml durante el segundo trimestre (Bianchi y col. 1.997). Por lo tanto, la concentración media de ADN fetal en plasma y suero maternos es de 21,1 (25,4/1,2) y 23,9 (28,7/1,2) veces más alta, respectivamente, que en la fracción celular de sangre materna en la misma gestación. La concentración relativa de ADN de plasma fetal con respecto al total es incluso superior. De este modo, en el embarazo temprano, el ADN fetal en el plasma materno constituye una media del 3,4% del ADN del plasma total. La respectiva cifra en el embarazo tardío es del 6,2%. Hamada y col. informaron que la frecuencia de células fetales en el segundo trimestre era del 0,0035% mientras en el tercer trimestre era del 0,008% (Hamada y col. 1.993). Por lo tanto, la proporción fetomaterna es 97S veces y 77S veces superior en el plasma materno que en la fracción celular en la respectiva edad gestacional. Por supuesto, la proporción fetomaterna en ADN del plasma es comparable con la que sigue a muchos protocolos de enriquecimiento de células fetales. Por ejemplo, Bianchi y col. informaron que tras el enriquecimiento de células rojas nucleadas fetales utilizando la clasificación celular activada por fluorescencia, las células fetales resultantes constituían el 0,001% de las poblaciones de células clasificadas determinada mediante análisis de PCR cuantitativo (Bianchi y col. 1.994). En un estudio similar en el que se utilizaba la clasificación celular y la detección de células fetales empleando la hibridación con fluorescencia *in situ*, Sohda y col. encontraron que un promedio de 4,6% de células clasificadas eran de origen fetal (Sohda y col. 1.997). El plasma materno, por lo tanto, ofrece una fuente de ADN fetal fácilmente accesible para el análisis genético prenatal.

Los autores de la presente invención han demostrado que la concentración absoluta de ADN fetal en plasma materno es similar a la del suero materno. La principal diferencia reside en la presencia de una cantidad más grande de ADN materno de fondo en suero en comparación con el plasma, posiblemente debido a la liberación de ADN durante el proceso de coagulación. Mientras este no ejerce un efecto notable sobre la eficacia de la detección del ADN fetal utilizando el sistema TaqMan a tiempo real, es posible que con la utilización de métodos menos sensibles, v.g., una PCR convencional seguida de electroforesis en gel de agarosa teñido con etidio, puede ser preferible el plasma materno al suero materno para una robusta detección de ADN fetal.

La elevada concentración de ADN fetal en plasma y suero materno ha permitido a los autores de la presente invención detectar fiablemente la presencia de material genético fetal. De las 263 muestras de suero o plasma analizadas en este estudio, los autores son capaces de detectar el gen SRY fetal en el plasma o suero materno de cada sujeto que porta un bebé varón en el momento de la venesección. Esta fuerte tasa de detección se obtuvo utilizando ADN extraído solo de 40-80  $\mu$ l de plasma y suero materno. Este volumen representa un incremento de 4-8 veces sobre los 10  $\mu$ l de plasma o suero materno hervido referido en el estudio previo de los autores de la presente invención (Lo y col. 1.997) y da como resultado una mejora significativa de la sensibilidad. La especificidad se conservaba ya que no se observaban señales de amplificación de las muestras obtenidas antes de la concepción o de los sujetos que portaban fetos hembra. A partir de los datos obtenidos hasta aquí, los análisis de plasma/suero no parecían ser afectados significativamente por la persistencia de células fetales de embarazos anteriores (Bianchi y col. 1.996). De este modo, los autores de la presente invención no obtenían falsos resultados positivos de mujeres que habían llevado un bebé varón anterior pero llevaban un bebé hembra en el momento de la toma de muestra de sangre para este estudio.

El estudio sucesivo de pacientes que padecían IVF daba numerosos resultados importantes. Primero, se demostró que las 12 pacientes que portaban bebés varones eran negativas para las secuencias SRY en sus sueros antes de la concepción. Esto proporcionaba una evidencia convincente de que la secuencia SRY detectada por el análisis TaqMan se originaba por supuesto a partir del feto varón en el embarazo actual. Segundo, los autores de la presente invención eran capaces de detectar secuencias SRY fetales tan pronto como a la 7ª semana de gestación; indicando de este modo que el análisis genético fetal en plasma/suero materno podía ser utilizado en el primer trimestre. Tercero, los autores de la presente invención demostraron que la concentración de ADN fetal aumentaba a medida que progresaba el embarazo (fig. 4). Este último punto también era confirmado por los datos obtenidos de mujeres estudiadas en un único momento puntual. Las mujeres reclutadas con un embarazo avanzado tenían concentraciones de ADN fetal superiores en su plasma y suero (Tabla 3).

## ES 2 198 700 T3

Además del incremento de concentración de ADN fetal a medida que el embarazo progresa, los datos de los autores de la presente invención también indican que el ADN del plasma materno también aumenta con la gestación (Tabla 2). La base biológica de este fenómeno no está clara en la actualidad. Entre las posibles explicaciones se incluyen el incremento de tamaño de la interfase fetomaterna a medida que la gestación progresa y la posible reducción del aclaramiento del ADN asociado con otros cambios fisiológicos del embarazo.

Para alteraciones seleccionadas, la información genética fetal podía ser adquirida más económica y rápidamente de plasma y suero que utilizando células fetales aisladas de sangre materna. Los autores de la presente invención preveen que el análisis del ADN fetal en el plasma y el suero maternos sea muy útil en situaciones en las que la determinación de polimorfismos/ mutaciones o genes heredados por vía paterna derivados del feto fuera provechosa en la diagnosis prenatal clínica (Lo y col. 1.994). Entre los ejemplos se incluyen la determinación del sexo del feto para la diagnosis prenatal de alteraciones ligadas al sexo, la determinación del estado rhesus D fetal en mujeres embarazadas rhesus negativas sensibilizadas (Lo y col. 1.993), las alteraciones dominantes autosómicas en las que el padre porta la mutación y las alteraciones genéticas recesivas autosómicas en las que el padre y la madre portan diferentes mutaciones (Lo y col. 1.994), v.g., ciertas hemoglobinopatías (Carnaschella y col. 1.990) y la fibrosis quística. Debido al fondo materno muy reducido y a la elevada concentración de ADN fetal en el plasma y el suero maternos, los autores de la presente invención pronostican que este tipo de análisis sería mucho más robusto en comparación con su aplicación para detectar células fetales no clasificadas en la sangre materna. La capacidad de discriminación alélica (Lee y col. 1.993; Livack y col. 1.995) permite utilizar el análisis TaqMan homogéneo para este fin. El elevado rendimiento total y la capacidad anti-contaminación de este sistema hacen de él un atractivo candidato para su aplicación clínica a gran escala.

Bianchi y col. informaron recientemente que las células fetales en la sangre materna aumentaban en los embarazos aneuploides (Bianchi y col. 1.997) y se ha demostrado (Ejemplo 2) que la concentración de ADN fetal en plasma y suero maternos también es elevada en estos embarazos. Esto proporciona un nuevo ensayo de rastreo de las alteraciones cromosómicas fetales. Para esta aplicación, se pueden desarrollar sistemas de cuantificación de ADN fetal para marcadores polimórficos fuera del cromosoma Y de manera que la cuantificación pueda ser aplicada a fetos hembra. Los sistemas polimórficos autosómicos que pueden ser utilizados para este fin ya han sido descritos (Lo y col. 1.996). Sin embargo, todavía serían necesarias técnicas de aislamiento de células fetales para una diagnosis citogenética definitiva. De un modo similar, también se requeriría el aislamiento de las células fetales para el análisis mutacional directo de las alteraciones recesivas autosómicas ocasionadas por un única mutación. Es probable que el aislamiento de las células fetales y el análisis del ADN fetal en el plasma/suero materno sea utilizado como técnica complementaria para la diagnosis prenatal no invasiva.

Queda por elucidar la base biológica por la cual el ADN fetal es liberado al plasma materno. Es posible que el ADN fetal sea liberado de la lisis celular resultante de la lesión física e inmunológica, o a través de la apoptosis de los tejidos fetales asociada inherentemente al desarrollo. Asimismo es probable que se puedan encontrar cantidades incrementadas de ADN fetal en estados asociados con la lesión placentaria, tales como la pre-eclampsia. El sistema de PCR cuantitativo a tiempo real descrito aquí ofrece una herramienta poderosa para estudiar estos aspectos patofisiológicos no explorados del ADN fetal en el plasma materno y puede mejorar la comprensión de la relación fetomaterna.

TABLA 2

*Análisis cuantitativo de plasma y suero materno utilizando el análisis TaqMan de la beta-globina*

	Media (copias/ml)	Mediana (copias/ml)	Intervalo (copias/ml)
Plasma (Embarazo Temprano + Tardío)	3.466	1.594	356-31.875
Suero (Embarazo Temprano + Tardío)	50.651	34.688	5.813-243.750
Plasma (Embarazo Temprano)	986	975	356-1.856
Plasma (Embarazo Tardío)	5.945	4.313	1.125-31.875

TABLA 3

*Cuantificación de ADN fetal en plasma y suero materno: relación con la edad gestacional*

	concentración SRY (Copias/ml)			
	Embarazo Temprano		Embarazo Tardío	
	Plasma	Suero	Plasma	Suero
Intervalo	3,3-69,4	4,0-58,1	76,9-769	33,8-900
Media	25,4	28,7	292,2	342,1
Mediana	20,6	19,5	244,0	286,0

*Leyendas de las figuras*

Figura 1. ADN fetal en suero materno de mujeres que portan fetos aneuploides y normales. Los grupos de control y aneuploides se indican en el eje de las x. Las concentraciones de ADN SRY fetal expresadas en copias/ml se trazan en el eje de las y.

Figura 2. ADN fetal en suero materno de embarazos pre-eclámpticos y no pre-eclámpticos. Los grupos pre-eclámpticos y de control se indican en el eje de las x. Las concentraciones de ADN SRY fetal expresadas en copias/ml se trazan en el eje de las y.

Figura 3. PCR cuantitativa a tiempo real.

A. Gráficos de amplificación obtenidos utilizando la PCR cuantitativa a tiempo real para el gen SRY. Cada gráfico corresponde a una cantidad diana de entrada concreta marcada por el correspondiente símbolo. El eje de las x indica el número de ciclos de una reacción de PCR cuantitativa. El eje de las y indica el  $\Delta Rn$  que es la intensidad de fluorescencia sobre el fondo (Heid y col. 1.996).

B. Gráfico del ciclo umbral ( $C_T$ ) frente a la cantidad diana de entrada (escala logarítmica corriente). El coeficiente de correlación es 0,986.

Figura 4. Estudio secuencial de 12 mujeres que portan fetos varones concebidos mediante fertilización *in vitro*. Cada caso se indica mediante un número de caso de reclutamiento único. El eje de las x indica la gestación en la cual se obtuvo la muestra de suero. Una edad de gestación cero indica la muestra pre-concepción. El eje de las y indica la concentración de SRY fetal en suero materno expresada en copias/ml. La escala ha sido optimizada para el intervalo de concentración para cada caso.

**Referencias**

**Aubin J.T. Le Van Kim C. Mouro I,** y col. Specificity and sensivity of RhD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Haematol.* 1.997, 98: 356-364.

**Bennet P.R. Le Van Kim C. Colin Y,** y col. Prenatal determination of foetal RhD type by DNA amplification. *N. Engl. J. Med.* 1.993: 329:607-610.

**Bianchi D.W. Mahr A. Zickwolf GK, Houseal TW. Flint AF, Klinger KW.** Detection of foetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood. *Hum. Genet.* 1.992; 90:368-370.

**Bianchi D.W. Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW (1.994).** Foetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative PCR. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171: 992-926.

**Bianchi D.W. Williams J.M. Pelletier C, Klinger KW, Shuber AP,** Foetal cell quantification in maternal blood samples from normal and aneuploid pregnancies. *Pediatr. Res.* 1.986: 39 142A.

**Bianchi D.W. Williams J.M. Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP,** PCR quantitation of foetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.* 1.997; 61822-829.

**Camaschella C. Alfarano A, Gottardi E,** y col. Prenatal diagnosis of foetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood. *Blood* 1.990, 75: 2102-106.

**Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C.** y col. Molecular cloning and protein structure of a human blood group

## ES 2 198 700 T3

Rh polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.990; 87:6243-6247.

**Chen X Q, Stroum M, Magnenat J-L** y col. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat. Med.* 1.996; 2:1033-35.

5

**Cheung M C, Goldberg JD, Kan YW.** Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and thalassemia by analysis of foetal cells in maternal blood. *Nat. Genet.* 1.996; 14: 264-68.

10

**Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, van Huffel V, Cartron J-P.** Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by *Southern analysis Blood* 1.991; 78: 2747-2752.

**Elias S, Price J, Dockler M, Wachiel S, Tharapel A, Simpson JL.** First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in foetal cells from maternal blood. *Lancet* 1.992; 340: 1033.

15

**Emmanuel S.L. Pesika S.** Amplification of specific gene products from human serum. *GATA* 1.993; 10: 144-48.

**Frickhofen N. & Young N.S.** A rapid method of sample preparation for detection of DNA viruses in human serum by polimerase chain reaction *J. Virological Methods* 1.991; 35:65-72.

20

**Geifman-Holtzman O, Bernstein I M, Berry S M, y col.** Petal RhD genotyping in fetal cells flow-sorted from maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1.996; 174: 616-822.

**Hamada H. Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H (1.993).** Foetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hu. Genet* 91:427-432.

25

**Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.** Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1.996; 6:986-994.

30

**Holland P M, Abramson RD, Watson R, Gelfand D H.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilising the 5'-3'-exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.991; 88: 7276-7280.

**Kwok S. Higuchi R.** Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1.989; 339:237-238.

35

**Le Van Kim C, Mouro I, Cherif-Zahar B, y col.** Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.992; 89:10925-10929.

**Lee L.G. Conell C R, Bloch W,** Alldic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1.993; 21: 3761-3766.

40

**Livack K J, Flood S J, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.** Oligonucleotides with fluorescent dyes al opposite end provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hibridization. *PCR Methods Appl.* 1.995, 4:357-362.

45

**Lo Y M D, Corbetta N, Chamberlain P F, Rai V, Sargent I L, Redman C W G. Wainscoat J S (1.997).** Presence of foetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350: 485-487.

**Lo Y M D, Fleming K A, Wainscoat J S (1.994).** Strategies for the detection of autosomal foetal DNA sequence from maternal peripheral blood. *Ann NY Acad. Sci.* 731: 204-213.

50

**Lo Y M D, Patel P, Wainscoat J S, Sampietro M, Gilmer M D G, Fleming K A.** Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1.989, 2:1363-65.

55

**Lo Y M D, Lo E S F, Watson N, y col.** Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1.996; 88:4390-95.

**Lo Y M D, Patel P, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA, Wainscoat JS.** Detection of single-copy foetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1.990; 335:1463-64.

60

**Lo Y M D, Bowell PJ, Selinger M y col.** Prenatal determination of foetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* 1.993; 341:1147-48.

**Longo M C, Berninger MS, Hardley JL.** Use of uracil DNA glycosilase to control calTy-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1.990; 93:125-128.

65

**Mulcahy H E, Croke D T, Farthing M J G.** Cancer and mutant DNA in blood plasma. *Lancet* 1.996; 348:628.

**Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D.** Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck

## ES 2 198 700 T3

patients. *Nar. Med.* 1.996; 2:1035-37.

**Rebello M.T. Hackett G. Smith J,** y col. Extraction of DNA amniotic fluid cells for the early prenatal diagnosis of genetic disease. *Prenat. Diagn.* 1.991; 11:41-46.

5

**Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S,** y col. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1.988; 239:487-91.

10

**Sekizawa A, Watanabe A,T.K. Saito H, Yanaihara T, Sato T.** Prenatal diagnosis of the foetal RhD blood type using a single foetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet. Gynecol.* 1.996; 87:501-505.

**Simpson J L, Elias S.** Isolating foetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1.993; 270:2357-61.

15

**Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H.** The proportion of foetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat. Diagn.* 17:743-752.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 198 700 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de detección realizado sobre una muestra de plasma o suero materno de una hembra embarazada, cuyo método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de origen fetal en la muestra.
2. Un método según la reivindicación 1, donde dicha detección comprende cuantificar dicho ácido nucleico.
3. Un método según la reivindicación 1, donde dicha detección comprende detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico.  
10
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha detección comprende amplificar dicho ácido nucleico.
- 15 5. Un método según la reivindicación 4, donde dicha amplificación es mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
6. Un método según la reivindicación 4 o 5, donde en dicha amplificación se utiliza al menos un cebador oligonucleotídico específico de la secuencia fetal.
- 20 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho ácido nucleico es heredado por vía paterna.
8. Un método según la reivindicación 7, donde se detecta la presencia de una secuencia de ácido nucleico fetal del cromosoma Y.  
25
9. Un método según la reivindicación 8, para determinar el sexo del feto.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho ácido nucleico es de un cromosoma distinto de Y heredado por vía paterna.  
30
11. Un método según la reivindicación 10, donde dicho ácido nucleico es el gen Rhesus D.
12. Un método según la reivindicación 11, para el genotipaje Rhesus D de un feto en una madre Rhesus D-negativa.
- 35 13. Un método según la reivindicación 2, que comprende determinar la concentración de la secuencia de ácido nucleico fetal en el suero o plasma materno.
14. Un método según la reivindicación 13, donde dicha determinación es mediante PCR cuantitativa.
- 40 15. Un método según la reivindicación 13 o 14, para la detección de una afección materna o fetal en la que el nivel de ADN fetal en suero o plasma materno es más alto o más bajo que el normal.
16. Un método según la reivindicación 15, donde el patrón de variación de la concentración de ADN fetal en suero o plasma materno en diferentes fases de gestación es diferente del normal.  
45
17. Un método según la reivindicación 15 o 16, para la detección de la pre-eclampsia.
18. Un método según la reivindicación 15 o 16, para la detección de una aneuploidía cromosómica fetal.
- 50 19. Un método según la reivindicación 18, donde dicha aneuploidía cromosómica fetal es el Síndrome de Down.
20. Un método de realización de una diagnosis prenatal, cuyo método comprende:  
55 (i) separar una muestra de sangre prenatal en una fracción celular y no celular;  
(ii) detectar la presencia de un ácido nucleico de origen fetal en la fracción no celular utilizando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19; y  
60 (iii) proporcionar una diagnosis basada en la presencia y/o cantidad y/o secuencia del ácido nucleico fetal.

## ES 2 198 700 T3

21. Un método según la reivindicación 20, donde dicha fracción no celular utilizada en la etapa (iii) es una fracción de plasma.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---

Fig.1.

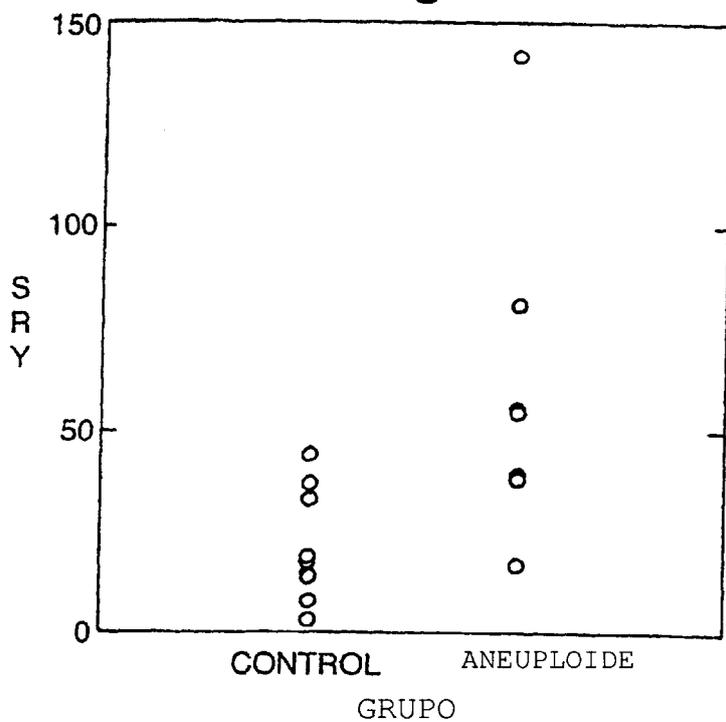


Fig.2.

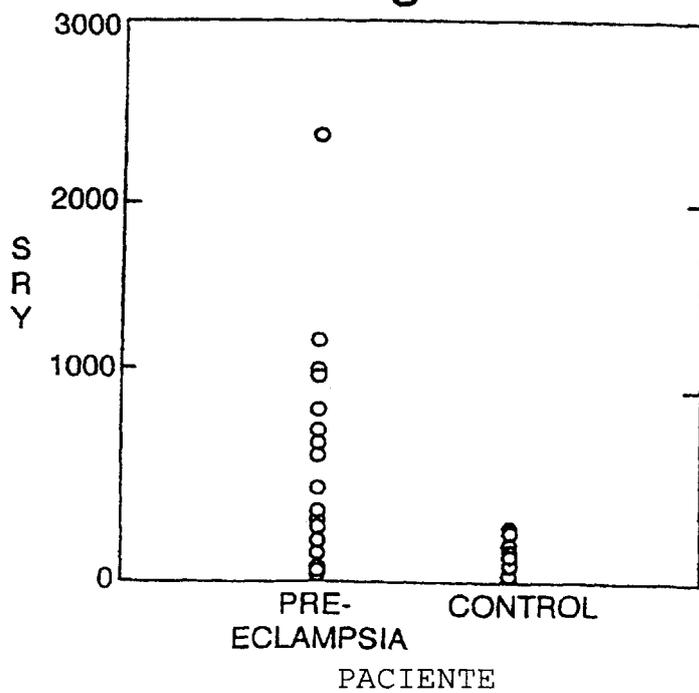


Fig.3A.

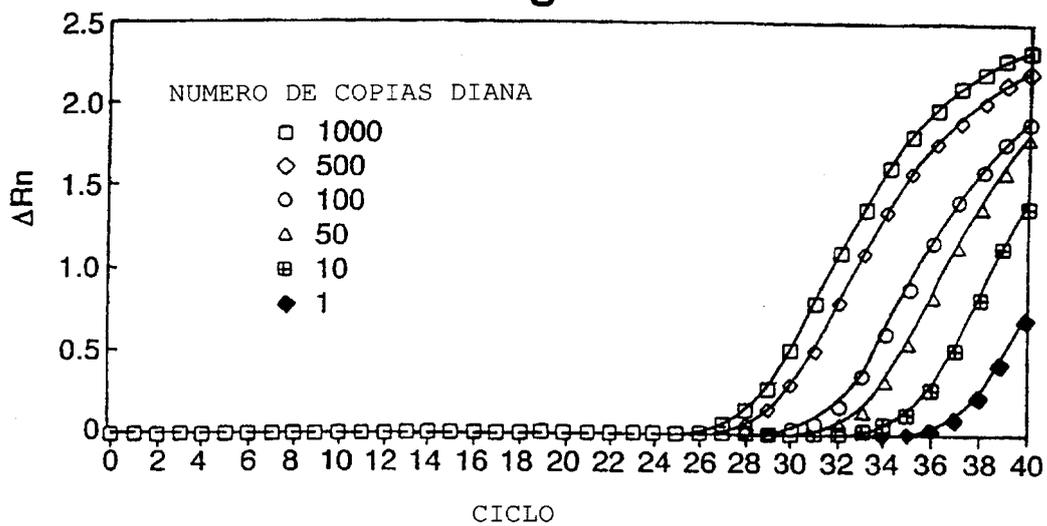
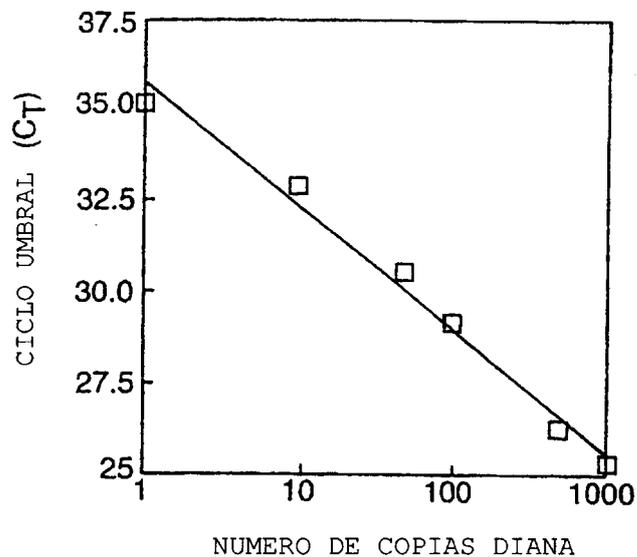


Fig.3B.



**FIG. 4**

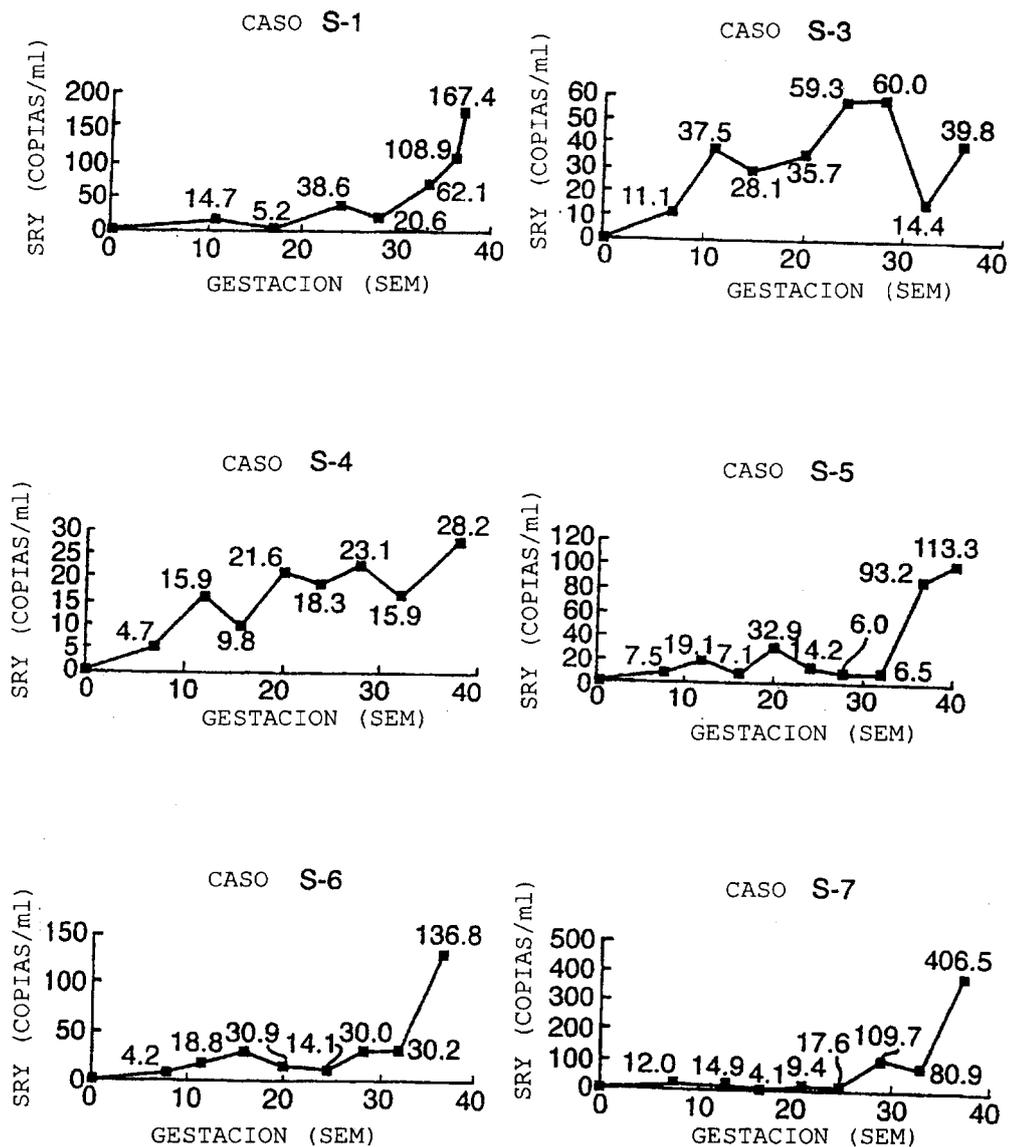


FIG. 4 (Cont.)

