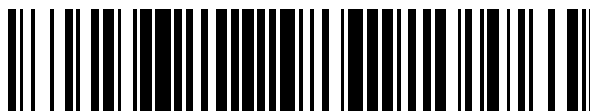


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 038**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09705752 .5**
96 Fecha de presentación: **30.01.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2245195**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2010**

54 Título: **Enriquecimiento en dos etapas del ADN acelular en el plasma materno**

30 Prioridad:
30.01.2008 US 24872 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:
BISCHOFF, FARIDEH

74 Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 389 038 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

Enriquecimiento en dos etapas del ADN acelular en el plasma materno.

- 5 [0001] Aunque aparece ADN fetal en el plasma materno, los niveles son relativamente bajos como para permitir realizar un análisis genético prenatal de rutina. Sin estar ligado a ninguna teoría, los autores consideran que la porción de ADN fetal está empaquetada y, por tanto, protegida de las endonucleasas plasmáticas. Se propone una nueva técnica de enriquecimiento que combina dos procedimientos diferenciados. En primer lugar el plasma separado se trata con ADNasa para disminuir de forma eficaz el porcentaje de fragmentos contaminantes de ADN materno acelular. El aumento posterior de secuencias fetales se logra usando una técnica de amplificación del genoma completo (WGA, por sus siglas en inglés) modificada.
- 10 [0002] **Procedimientos:** el plasma se aisló de la sangre completa materna (n=24); a continuación, se trató con concentraciones crecientes de ADNasa. El ADN tratado con ADNasa se procesó adicionalmente usando el mini kit de extracción de ADN de Qiagen antes de un protocolo WGA modificado para enriquecer en fragmentos de ADN más pequeños. La presencia de secuencias fetales se confirmó usando PCR en tiempo real (PCR-TR) Taqman para determinar los niveles de β -globina y de secuencias DYS1.
- 15 [0003] **Resultados:** las secuencias de ADN fetal se detectaron siguiendo todos los tratamientos de ADNasa. La detección correcta de fetos varones se consiguió en todas las muestras en las que se confirmó que había un feto varón (n=10) tanto antes como después de la WGA. Además de la correcta determinación del género, las muestras (n=7) que se sometieron a la cantidad más alta de ADNasa así como al protocolo de WGA modificado mostraron un enriquecimiento significativo de secuencias fetales, consiguiendo el 50% del ADN fetal.
- 20 [0004] **Conclusiones:** los resultados confirman que el ADN fetal en plasma está protegido y es resistente a la degradación debido al tratamiento con ADNasa. Estos datos preliminares también sugieren que puede conseguirse un nivel óptimo de tratamiento con ADNasa que permite un enriquecimiento adicional usando WGA. La observación de que la ADNasa elimina predominantemente secuencias maternas sugiere que el ADN fetal acelular está empaquetado forma diferenciada con respecto al equivalente materno, lo que permite el enriquecimiento preferencial de las secuencias fetales.
- 25

INTRODUCCIÓN

- [0005] El diagnóstico genético prenatal depende de procedimientos invasivos como la amniocentesis o el muestreo de vellosidades coriónicas (CVS, por sus siglas en inglés). Aunque estos procedimientos han proporcionado resultados fiables durante muchos años siguen comportando un pequeño riesgo para el feto (1). Desde el descubrimiento de ácidos nucleicos acelulares fetales amplificables en el plasma materno (2), se han realizado numerosos estudios cuyo objetivo era determinar el potencial de las pruebas genéticas prenatales clínicas no invasivas. Aunque muchos de estos estudios se ha mostrado muy prometedores, las pequeñas cantidades existentes de ADN fetal han hecho que sea difícil implementarlas a nivel clínico. Por tanto, los autores de la patente se han centrado en la mejora de los procedimientos de aislamiento y enriquecimiento de ADN fetal. Sin estar ligado a ninguna teoría, se considera que estos nucleótidos en circulación son el resultado de las células fetales que sufren apoptosis (3). La estabilidad relativa de ADN y ARN acelular en plasma, que se sabe contiene nucleasas, sugiere que estos ácidos nucleicos están en circulación dentro de vesículas ligadas a membrana formadas como resultado del mecanismo de muerte celular programada (4). Estos fragmentos de ADN fetal también se distinguen de los fragmentos maternos en base al tamaño, siendo los fragmentos fetales generalmente menores (<300 pb) que los fragmentos maternos (>500 pb) (5; Jorgez C. y col., 2007). Dhallen y col. (JAMA 2004; 291(9):1114-1119) describen que la adición de formaldehído a las muestras de sangre materna, conjugada con protocolos de procesamiento cuidadosos, aumenta el porcentaje relativo de ADN fetal libre, proporcionando una base para el desarrollo de pruebas diagnósticas prenatales no invasivas para distinguir el ADN fetal del ADN materno en la circulación materna. Jorgez y Bischoff (Fetal Diagnosis and Therapy 2009; 25(3): 314-319) describen que la combinación de electroforesis para la separación por tamaño y la WGA llevan al enriquecimiento en ADN fetal del plasma. Huang y col. (Annals of the New York Academy of Sciences 2006: 308-312) compararon procedimientos manuales y automáticos de extracción de ADN y describieron que aunque con el procedimiento manual se producía más ADN acelular total, el sistema automático producía cantidades más altas de ADN acelular de origen fetal. Además, el ADN aislado usando el sistema automático parecía tener una mayor pureza que el aislado mediante el procedimiento manual, con pocos inhibidores para las reacciones posteriores a la PCR en tiempo real.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- [0006] Los autores describen un nuevo procedimiento en dos etapas para el enriquecimiento de fragmentos fetales. La primera etapa supone el tratamiento del plasma materno total (que contiene tanto fragmentos de ADN materno como fetal) con ADNasa. Dado que los fragmentos fetales son más estables y probablemente están empaquetados por membranas unidas a cuerpos apoptóticos, se establece la hipótesis de que el tratamiento con ADNasa podría eliminar el total de secuencias derivadas de la madre (no empaquetadas). La segunda etapa supone un protocolo de amplificación del genoma completo (WGA) modificado diseñado para amplificar los fragmentos más pequeños, preferiblemente fetales.
- 55

PROCEDIMIENTOS

[0007] Tras la aprobación del CIR y la obtención del consentimiento informado, se extrajeron un total de 24 muestras de sangre completa (10 embarazos de varones confirmados, media de edad de gestación 18 1/7 semanas oscilando de 11 4/7 a 25 2/7 semanas; 12 embarazos de hembras confirmados; media de edad de gestación 20 1/14 semanas oscilando de 9 6/7 a 37 4/7 semanas y 2 controles sin embarazo, una mujer y un varón). Para cada caso, se procesaron aproximadamente 30 ml de sangre obtenidos con vacutainer ACD mediante una centrifugación inicial a 800 g durante 10 min para separar el plasma de la fracción celular. La fracción plasmática se retiró y se centrifugó de nuevo a 16.000 g durante 10 min para eliminar de nuevo cualquier contaminación por partículas celulares. A continuación, esta fracción se congeló en alícuotas de 800 µl y, posteriormente, se descongelaron para el procesamiento simultáneo del lote. Cada muestra de plasma de 800 µl se descongeló a temperatura ambiente y después se sometió a tratamiento con ADNasa (Promega, N° de catálogo M6101) a diversas concentraciones (sin tratar, 1 µl, 5 µl, 10 µl, 30 µl de una unidad/µl). Las muestras se incubaron a 37°C durante una hora antes de añadir la solución de parada. A continuación, las muestras se sometieron a extracción usando el mini kit para sangre QiAamp de Qiagen (N° de catálogo 51106) y se eluyó un volumen final de 100 µl. Con leves modificaciones, se siguió el protocolo de amplificación del genoma completo (WGA) GenomaPlex® (Sigma, N° Cat. WGA2-50rxn) en siete muestras de sangre materna (4 varones confirmados y 3 hembras confirmadas). Se modificó el procedimiento omitiendo en primer lugar la incubación de fragmentación sugerida por el fabricante debido al tamaño previsto de las secuencias diana. En segundo lugar se aumentó a 20 el número de ciclos en la fase de amplificación en lugar de los 14 sugeridos. Las muestras amplificadas se conservaron a 4°C hasta el análisis por PCR-TR para la detección y cuantificación de β-globina (BGL0345F: GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A, BGLO455R: CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG) (6) y DYS1 (DYS1F: TCC TGC TTA TCC AAA TTC ACC AT, DYS1R: ACT TCC CTC TGA CAT TAC CTG ATA ATT G) (7) (Applied Biosystems 7700, Foster City, CA). El nivel de enriquecimiento se determinó en base al % de ADN fetal que se calculó como relación entre DYS1β -globina. La β-globina representa la cantidad total de ADN aislado, materno y fetal, mientras que en los embarazos de varones confirmados DYS1 representa la cantidad de ADN fetal presente en la muestra.

RESULTADOS

[0008] Tras los tratamientos iniciales con ADNasa en las muestras controles sin embarazo, tanto los niveles de β-globina como de DYS1 disminuían en función de la cantidad de enzima añadida. En cada caso se eliminó de forma eficaz mediante el tratamiento con ADNasa. (Figura 1). En las muestras maternas, aunque los niveles detectados de β-globina disminuyeron, estos niveles eran persistentes a pesar de tratamientos más duros con ADNasa (916,5 ± 91,2 Geq/ml para los casos maternos varones y 610,5 ± 389,62 Geq/ml para los casos maternos hembras). No se detectaron falsos positivos para los niveles de DYS1 en ninguno de los embarazos de hembras conocidos. Sin embargo, entre los embarazos con fetos varones conocidos (n=10), se obtuvo una detección del 100% de las secuencias de DYS1 para todos los aumentos de tratamiento (0 µl: 127,4 ± 72,3 Geq/ml, 1 µl: 71,4 ± 57,3 Geq/ml, 5 µl: 71 ± 58,6 Geq/ml, 10 µl: 57,1 ± 46,6 Geq/ml, 30 µl: 154 ± 179,6 Geq/ml).

[0009] La WGA se llevó a cabo en siete muestras maternas tratados con ADNasa (3 hembras y 4 varones). Aunque se detectaron secuencias fetales en todas las muestras, sólo se observaron aumentos de los niveles de secuencias de DYS1 fetales en las muestras sometidas a 30 µl de ADNasa (0 µl: 1.979 ± 2.083,9 Geq/ml, 1 µl: 1,62 ± 1,6 Geq/ml, 5 µl: 723,5 ± 875,7 Geq/ml, 10 µl: 0,83 ± 1,22 Geq/ml, 30 µl: 7.025 ± 4.381 Geq/ml). Por tanto, esto indica que eran necesarios tratamientos con ADNasa más rigurosos para disminuir las secuencias maternas (en base a la β-globina) hasta el grado en el que no estén presentes en niveles que se produzca una amplificación más competitiva de las secuencias de DYS1. En las muestras que se sometieron a tratamiento con 30 µl de ADNasa seguido del protocolo WGA modificado, los autores fueron capaces de conseguir un valor medio del 49,96% de ADN fetal. En las muestras que no se habían tratado con ADNasa y sólo se sometieron a la WGA modificada, el porcentaje medio de ADN fetal entre las muestras era del 11,16%. Las muestras que fueron tratadas con 1, 5 o 10 µl de ADNasa a una unidad/µl presentaban todas valores de ADN fetal del 0,01%, 3,5% y 0,01%, respectivamente tras la WGA. Antes de la WGA las muestras presentaban porcentajes que oscilaban del 0,05% al 0,17%.

DISCUSIÓN

[0010] Estos resultados demuestran que el ADN fetal acelular es resistente a la degradación por ADNasa lo que apoya la hipótesis de que el ADN fetal acelular está empaquetado en vesículas unidas a membrana. Los autores han eliminado de forma eficaz las secuencias maternas así como cualquier secuencia contaminante que pueda inducir resultados de falsos positivos. Los niveles de ADN fetal acelular persiste en las muestras de pacientes frente a las muestras control. Estos resultados confirman que las secuencias fetales son resistentes a la degradación y están protegidas o empaquetadas de forma diferencial con respecto a las secuencias maternas. Los niveles de β-globina representan el ADN total (maternal y fetal), por lo que la imposibilidad de detectar la digestión completa de la β-globina no es sorprendente debido a que es probable que una porción sea fetal. Parece que las secuencias fetales tienen una característica molecular exclusiva, que las diferencia de las secuencias maternas y permite su enriquecimiento. La detección de todos los casos varones y que no se observen falsos positivos sugieren que el tratamiento con ADNasa tiene una aplicación novedosa en la eliminación de las secuencias maternas no deseadas que se han degradado adicionalmente durante la circulación.

[0011] El kit de amplificación del genoma completo GenomePlex® (Sigma-Aldrich) amplifica el ADN genómico usando en primer lugar la fragmentación aleatorizada del ADN y, a continuación, la unión al extremo de una secuencia común que se usa para amplificar todos los fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se eliminó del procedimiento la etapa de fragmentación para prevenir que las secuencias maternas más largas se fragmenten para la amplificación posterior. Esto posiblemente proporciona a las secuencias fetales fragmentadas preexistentes pequeñas una ventaja durante la amplificación. La WGA aumentaba la relación entre ADN fetal y materno en las muestras que se sometieron a los tratamientos más estrictos con ADNasa. Antes de la WGA, el % medio de ADN fetal era <1% a todos los niveles de tratamiento. Sin embargo, se alcanzó el 50% de ADN fetal en las muestras tratadas con 30 µl de ADNasa junto con el protocolo de WGA modificado, lo que sugiere que este es un procedimiento viable de enriquecimiento de ADN fetal acelular en el plasma materno. En base a los niveles de β-globina, parece que la ADNasa reduce la cantidad de secuencias maternas presentes en la muestra, lo que permite que se amplifiquen las secuencias fetales. La degradación de los ácidos nucleicos maternos previene la competición durante la amplificación de las secuencias fetales en la reacción de PCR. Las muestras sometidas a tratamientos más suaves con ADNasa (1, 5 o 10 µl) mostraron proporciones entre ADN fetal y materno más bajas tras la WGA que las muestras no tratadas con ADNasa. Una posible explicación es que en estas muestras, las secuencias maternas más largas se degradaban, pero no se eliminaban por completo, reemplazando en efecto a la etapa de fragmentación del protocolo original de WGA, lo que permitía una amplificación más eficaz de las secuencias maternas.

[0012] Los autores describen una combinación de procedimientos que permiten superar dos complicaciones principales que han limitado las pruebas genéticas no invasivas de ADN prenatal: baja relación entre ADN fetal y materno y pequeña cantidad de ADN fetal. En general, este nuevo proceso de enriquecimiento en dos etapas muestra un mayor potencial para el enriquecimiento selectivo seguido de amplificación.

AGRADECIMIENTOS

[0013] Subvención del NIH.

BIBLIOGRAFÍA

[0014]

1. Tabor A, Philip J, Madsen M, Banq J, Obel EB, Nørgaard Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986;8493:1287-93.
2. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW y Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
3. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Human Reproductive Update* 2004;11:59-67.
4. Orozco AF, Bischoff FZ, Home C, Popek E, Simpson JL, Lewis DE. Hypoxia-induced membrane-bound apoptotic DNA particles: potential mechanism of fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:57-62.
5. K.C. Allen Chan, Jun Zhang, Angela B.Y. Hui, Nathalie Wong, Tze K. Lau, Tse N. Leung, Kwok-Wai Lo, Dolly W.S. Huang y Y.M. Dennis Lo. Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry* 2004, 500:88-92.
- Carolina J. Jorgez, Farideh Z. Bischoff. Improving Utility of Circulating DNA for Prenatal Genetic Testing: Fragment Size and Purity. 2007
6. Y M Lo, M S Tein, T K Lau, C J Haines, T N Leung, P M Poon, J S Wainscoat, P J Johnson, A M Chang y N M Hjelm. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:768-75.
7. Tuangsit Wataganara, Erik LeShane, Antonio Farina, Geralyn M. Messerlian, Thomas Lee, Jacob A. Canick, Diana W. Bianchi. Maternal Serum Cell-Free DNA Levels are Increased in Cases of Trisomy 13 but not 18. *Hum Genet* 2003;112:204-8

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para enriquecer el ácido nucleico fetal que comprende tratar una muestra biológica de un huésped materno que contiene ácido nucleico fetal acelular con una composición que comprende un agente con actividad ADNasa, en el que un primer porcentaje de ácido nucleico fetal en la muestra biológica previa al tratamiento es más bajo que un segundo porcentaje de ácido nucleico fetal en la muestra biológica tras el tratamiento y en el que un primer porcentaje del ácido nucleico materno en la muestra biológica previa al tratamiento es mayor que un segundo porcentaje de ácido nucleico materno en la muestra biológica después del tratamiento.
5
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre de un huésped materno.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de plasma o suero de un huésped materno.
10
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente con actividad ADNasa es ADNasa.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente con actividad ADNasa es ADNasa y la cantidad de ADNasa es de aproximadamente 10 a 200 unidades/ μ l.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo porcentaje es de aproximadamente el 10% al 50%.
15
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo porcentaje es de aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40% o 50%.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 que además comprende la amplificación del ácido nucleico fetal en la muestra biológica tras el tratamiento.
9. El procedimiento de la reivindicación 1 que además comprende la amplificación del ácido nucleico fetal en la muestra biológica tras el tratamiento mediante el procedimiento de amplificación del genoma completo (WGA).
20
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el procedimiento de WGA se realiza sin incubación de fragmentación.

Niveles de ADN tras el tratamiento del plasma con ADNasa. Los niveles de ADN en plasma se muestran como porcentaje de ADN restante tras el tratamiento con ADNasa (el tratamiento con 0 μ se establece como punto cero). Las muestras probadas incluyen plasma de casos maternos hembras (panel A) y varones (panel B) que se sometieron a tratamiento con 0, 1, 5, 10 y 30 μ l de ADNasa (1 unidad/ μ l). Como controles, el plasma masculino y femenino sin embarazo se sometió a 0, 1, 5 y 10 μ l de ADNasa (1 unidad/ μ l). En las gráficas se representan puntos con desviación estándar (barras). La PCR-TR se realizó para determinar los niveles de β -globina (Bglo) y DYS1 tras el tratamiento con ADNasa.

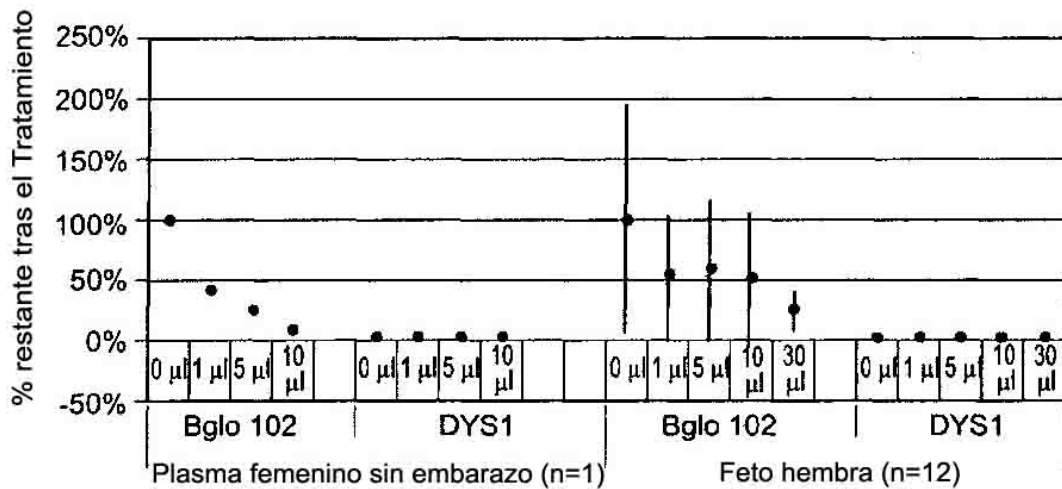


FIG. 1A

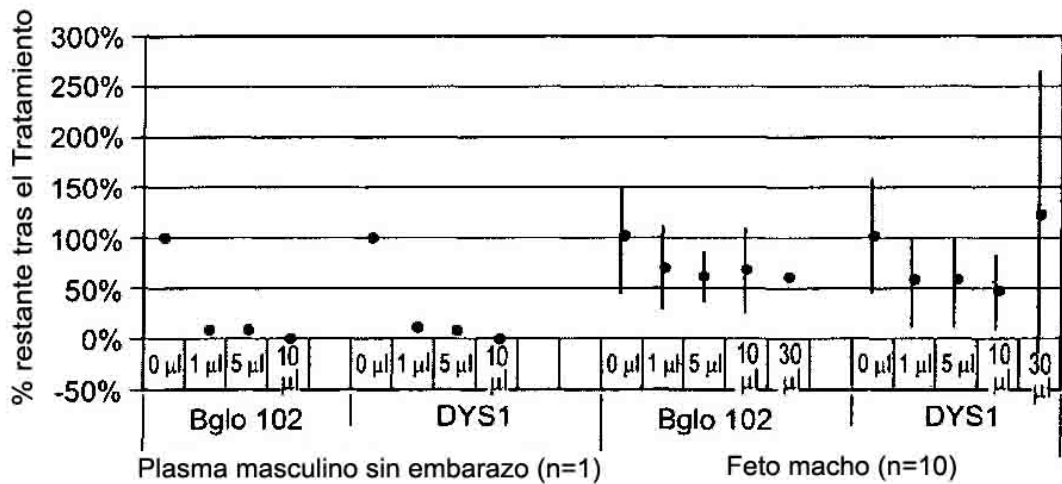


FIG. 1B