

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 055**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10161334 .7**
96 Fecha de presentación: **29.05.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **2216416**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2010**

54 Título: **Métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos en orina**

30 Prioridad:
30.05.1997 US 48170 P
30.06.1997 US 48381 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:
TROVAGENE, INC. (100.0%)
11055 FLINTKOTE AVENUE
SAN DIEGO, CA 92121, US

72 Inventor/es:
LICHTENSTEIN, ANATOLY V.;
MELKONYAN, HOVSEP, S y
UMANSKY, SAMUIL, R.

74 Agente/Representante:
SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 389 055 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos en orina

5 La presente invención comprende métodos no invasivos para detectar la presencia de secuencias de ácidos nucleicos específicas mediante el análisis de muestras de orina para la presencia de ácidos nucleicos que han cruzado la barrera renal. Más específicamente, la presente invención comprende métodos para detectar alteraciones específicas de los ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades, tales como infecciones por patógenos. La presente exposición comprende además métodos para detectar secuencias fetales específicas de ácidos nucleicos mediante el análisis de orina materna para la presencia de ácidos nucleicos fetales. La presente exposición comprende además métodos para detectar alteraciones de ácidos nucleicos específicos para el diagnóstico de enfermedades, tales como el cáncer.

15 El material genético humano es una fuente muy valiosa de información. A lo largo de las últimas décadas, la investigación científica ha desarrollado muchos procedimientos para analizar y manipular este material genético (ácidos nucleicos, ADN y ARN) para una diversidad de usos. Estas aplicaciones de la biología molecular se encuentran en el corazón de numerosas técnicas médicas modernas de diagnóstico y de tratamiento. De esta manera, han adquirido la máxima importancia los medios para la obtención, aislamiento y análisis de este material genético.

20 Hasta el momento, la frágil naturaleza de los ácidos nucleicos, y su situación, encapsulados dentro de las células, ha provocado que la adquisición de material genético para el diagnóstico fuese en determinados casos necesariamente invasiva. Por ejemplo, el diagnóstico de tumores con frecuencia requiere la cirugía para la obtención de células tumorales. De manera similar, los médicos llevan a cabo las amniocentesis con el fin de obtener ADN fetal para una diversidad de usos diagnósticos. Este procedimiento requiere la inserción de una aguja a través del abdomen de una mujer embarazada y en el interior del saco amniótico. Estas prácticas invasivas comportan un nivel de riesgo tanto para el feto como para la madre. Aunque los avances en los ultrasonidos han dado lugar a procedimientos alternativos menos intrusivos de seguimiento fetal durante el embarazo, estos procedimientos no resultan apropiados para diagnosticar determinados defectos genéticos y no resultan efectivos durante las etapas tempranas del embarazo, ni siquiera para determinar el sexo fetal.

35 Unos estudios recientes sobre diversos mecanismos y consecuencias de la muerte celular han revelado una potencial alternativa a las técnicas invasivas descritas anteriormente. Se encuentra bien establecido que la muerte celular apoptótica con frecuencia se ve acompañada por la fragmentación internucleosómica específica del ADN nuclear. Sin embargo, no se ha investigado en detalle cuál es el destino de estos productos de degradación de la cromatina en el organismo.

40 Basándose en la morfología de las células moribundas, se cree que existen dos tipos diferenciados de muerte celular: la necrosis y la apoptosis (Kerr, J.F. *et al.*, Br. J. Cancer 26:239-257, 1972). La muerte celular es un suceso esencial en el desarrollo y funcionamiento de los organismos multicelulares. En los organismos adultos, la muerte celular desempeña un papel complementario a la mitosis en la regulación de las poblaciones celulares. La patogénesis de numerosas enfermedades implica el fallo de la homeostasis de los tejidos, que se supone que se encuentra asociada a la lesión citotóxica o a la pérdida del control normal de la muerte celular. La apoptosis puede observarse durante las primeras etapas de la embriogénesis en la formación de los órganos, en la sustitución de un tejido por otro y en la reabsorción de órganos temporales.

50 La necrosis con frecuencia está marcada por un incremento temprano en el volumen celular total y en el volumen de los orgánulos subcelulares, seguido de la autólisis. La necrosis se considera un fallo metabólico catastrófico que resulta directamente de un daño molecular y/o estructural severo. La apoptosis es una muerte celular programada no traumática que se produce naturalmente en el desarrollo y mantenimiento normales de los tejidos y órganos sanos. La apoptosis es un fenómeno biológico mucho más prevalente que la necrosis (Kerr, J.F. *et al.*, Br. J. Cancer 26:239-257, 1972; Umansky, S., Molecular Biology, traducido de Molekulyarnaya Biologiya, 30:285-295, 1996; Vaux, D.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2239-2244, 1996; Umansky, S., J. Theor. Biol. 97:591-602, 1982; Tomei, L.D. y Cope, F.D., editores, Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1991.

60 La apoptosis también constituye una función biológica crítica que se produce naturalmente durante la embriogénesis, durante la selección positiva y negativa de los linfocitos T y B, durante la muerte de linfocitos inducida por glucocorticoides, durante la muerte inducida por radiación y cambios de temperatura, y durante la muerte consecuente al agotamiento de factores de crecimiento específicos. Además, la apoptosis es una parte importante de la defensa del organismo frente a la infección vírica. Se ha observado apoptosis en focos preneoplásicos encontrados en el hígado tras la retirada del promotor tumoral fenobarbital, en la involución dependiente de hormonas de tejidos y en tumores con la retirada hormonal. Muchos fármacos antitumorales, incluyendo los inhibidores de

la topoisomerasa II, así como los factores de necrosis tumoral, inducen la muerte celular apoptótica. La muerte celular apoptótica se caracteriza por cambios morfológicos, tales como el encogimiento celular, la condensación y marginación de la cromatina, la formación de burbujas en el citoplasma ("blebbing") y el incremento de la permeabilidad membranal (Gerschenson *et al.*, FASEB J. 6:2450-2455, 1992, y Cohen y Duke, Ann. Rev. Immunol. 10:267-293, 1992). La fragmentación internucleosómica específica del ADN es una característica típica de muchas apoptosis, aunque cabe destacar que no de todas.

En las células necróticas, el ADN también se degrada, aunque ello es el resultado de la activación de enzimas hidrolíticos, que generalmente dan lugar a productos mononucleótidos y oligonucleótidos de ADN (Atanasyev, V.N. *et al.*, FEBS Letters 194:347-350, 1986).

Recientemente, se han descrito etapas más tempranas de la degradación del ADN nuclear. Se ha demostrado que, tras los tratamientos pro-apoptóticos, se inicia el corte del ADN con la formación de fragmentos de ADN de elevado peso molecular, en el intervalo de 50 a 300 kilobases, el tamaño del ADN que se halla en las asas cromosómicas (Walker, P.R. *et al.*, Cancer Res. 51:1078-1085, 1991; Brown, D.G. *et al.*, J. Biol. Chem. 268:3037-3039, 1993). Estos fragmentos de gran tamaño normalmente se degradan hasta formar nucleosomas y sus oligómeros. Sin embargo, en algunos casos de muerte celular apoptótica, sólo se observan fragmentos de ADN de elevado peso molecular (Oberhammer, F. *et al.*, EMBO J. 12:3679-3684, 1993). También existen datos sobre la aparición de estos fragmentos en algunos modelos de muerte celular necrótica (Kataoka, A. *et al.*, FEBS Lett. 364:264-267, 1995).

Los datos disponibles sobre el destino de estos productos de degradación de la cromatina en los organismos resultan de escasa utilidad. Los resultados publicados indican que únicamente pueden detectarse cantidades reducidas de ADN en el plasma o suero sanguíneo (Fournie, G.J. *et al.*, Gerontology 39:215-221, 1993; Leon, S. *et al.*, Cancer Research 37:646-650, 1977). Puede resultar difícil garantizar que este ADN no se originó a partir de glóbulos blancos como resultado de su lisis durante el tratamiento de las muestras.

Dos grupos han encontrado ADN extracelular con alteraciones microsatélite específicas para el cáncer pulmonar de células pequeñas y el cáncer de cabeza y cuello en suero y plasma humanos (Chen X.Q. *et al.*, Nature Medicine 2:1033-1035, 1996; Nawroz H. *et al.*, Nature Medicine 2:1035-1037, 1996). Otros han propuesto métodos para detectar secuencias oncogénicas mutadas en forma soluble en sangre (patente US No. 5.496.699, de George D. Sorenson). Sin embargo, la utilización de sangre o plasma como fuente de ADN resulta tanto intrusiva para el paciente como problemática para el técnico diagnóstico. En particular, una concentración elevada de proteínas (aproximadamente 100 mg/ml), así como la presencia de compuestos que inhiben la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dificultan el aislamiento y análisis del ADN.

Algunos grupos han identificado, mediante PCR, alteraciones del ADN o infecciones víricas en líquidos corporales, incluyendo orina. Ergazaki M. *et al.*, "Detection of the cytomegalovirus by the polymerase chain reaction, DNA amplification in a kidney transplanted patient", *In vivo* 7:531-4, 1993; Saito S., "Detection of H-ras gene point mutations in transitional cell carcinoma of human urinary bladder using polymerase chain reaction", Keio J. Med. 41:80-6, 1992; Mao L. *et al.*, "Molecular Detection of Primary Bladder Cancer by Microsatellite Analysis", Science 271:659-662, 1996. El ADN cuya detección ha sido descrita por estos grupos procede de células renales o de células de revestimiento de la vejiga. Durante la detección de la infección vírica, muchos virus infectan células de la vejiga, obteniendo de esta manera una entrada a la orina. Las descripciones no enseñan métodos para detectar secuencias de ADN en orina que no se originen en células de la vejiga o del riñón, y de esta manera no incluirían ADN que pasa a través de la barrera renal y permanece en forma detectable en la orina antes de la detección.

Maiwald M. *et al.*, Infection 23(3):173-179, mayo de 1995, describen la detección de *Borrelia burgdorferi* en muestras de orina mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Maiwald M. *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14:25-33, 1995, describen la detección de ADN de *Legionella* en muestras de orina humanas y de cobaya mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Murdoch D.R. *et al.*, Clin. Infect. Dis. 23:475-480, 1996, describen la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa para detectar ADN de *Legionella* en muestras de orina y de suero procedentes de pacientes con neumonía.

Karayannis P. *et al.*, British Medical Journal 290:1853-1855 (22 de junio de 1985), describen la detección de ADN de virus de la hepatitis B en saliva, orina y líquido seminal de portadores de antígeno "e" de la hepatitis B.

Se requiere un método no invasivo para obtener muestras de ácidos nucleicos de células situadas en el exterior del tracto urinario, para la utilización en aplicaciones diagnósticas y de seguimiento. La capacidad de obtener de

un modo no invasivo, y de analizar, secuencias de ácidos nucleicos específicas resultaría valioso para fines que incluyesen, aunque sin limitarse a ellos, la determinación del sexo de un feto en estadios tempranos del desarrollo, el diagnóstico de trastornos genéticos fetales, y la obtención de un diagnóstico precoz del cáncer. La presencia de secuencias génicas del cromosoma Y en la orina de una mujer gestante resultaría indicativa de un feto masculino. La presencia de secuencias génicas específicas de un determinado tipo de tumor en la orina de un paciente sería un marcador para dicho tumor. De esta manera, dichos métodos resultarían útiles para sugerir y/o confirmar un diagnóstico.

No se han descrito con anterioridad métodos para analizar ácidos nucleicos que han cruzado la barrera renal y se encuentran en la orina.

La presente invención proporciona un método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos no del huésped en un paciente, comprendiendo dicho método someter a ensayo una muestra de orina, obtenida de un individuo, para una secuencia de ácidos nucleicos que:

- (i) procede del exterior del tracto urinario,
 - (ii) ha cruzado la barrera renal, y
 - (iii) no se origina en las secuencias de ácidos nucleicos endógenas del paciente,
- en el que los ácidos nucleicos contaminantes en la muestra de orina que comprenden más de 1.000 pares de bases, ó 1.000 nucleótidos en el caso de que se encuentren desnaturalizados, resultan eliminados de la muestra previamente a la detección de dicho ácido nucleico que no es del huésped.

La invención comprende además métodos para detectar alteraciones de ácidos nucleicos específicos para el diagnóstico de una diversidad de enfermedades que se encuentran asociadas a la presencia de ácidos nucleicos patogénicos contaminantes.

La presente exposición comprende además métodos no invasivos de determinación del sexo fetal y/o diagnósticos de enfermedades mediante la evaluación de una muestra de orina para la presencia de secuencias de ácidos nucleicos específicas que han cruzado la barrera renal. Más específicamente, la presente exposición comprende métodos para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos fetales mediante el análisis de orina materna para la presencia de ácidos nucleicos fetales. La presente exposición comprende además métodos para detectar alteraciones específicas de los ácidos nucleicos para el diagnóstico de una diversidad de enfermedades que se asocian a la presencia de anomalías genéticas específicas.

La presente exposición comprende métodos de análisis de un fragmento de ADN fetal que ha cruzado las barreras placentaria y renal, que comprenden: obtener una muestra de orina que se sospecha que contiene ADN polimérico fetal que ha cruzado la barrera renal, procedente de una hembra gestante, y realizar un ensayo para la presencia de dicho ADN polimérico fetal en dicha muestra de orina.

La secuencia diana de ADN fetal puede ser, por ejemplo, una secuencia presente únicamente en el cromosoma Y. La etapa de realización de un ensayo para la presencia de una secuencia única de ADN fetal puede llevarse a cabo utilizando una o más de una diversidad de técnicas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la hibridación, la reacción cíclica con una sonda, la detección de productos de corte, la reacción en cadena de la polimerasa, la reacción en cadena de la polimerasa de tipo anidada, la reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de conformación de cadena única, la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación por desplazamiento de cadena y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. La etapa de llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa puede comprender la utilización de cebadores sustancialmente complementarios a una parte de la secuencia única de ADN fetal, y la secuencia única de ADN fetal puede ser una secuencia que se encuentra presente en el genoma paterno y que no se encuentra presente en el genoma materno.

La presente invención comprende además métodos que presentan la etapa de reducir la degradación del ADN en la muestra de orina. La reducción de la degradación del ADN puede realizarse mediante tratamiento con compuestos seleccionados de entre el grupo que consiste de: ácido etilendiaminatetraacético, HCl de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico. La degradación del ADN puede reducirse adicionalmente obteniendo una muestra de orina que se ha mantenido dentro de la vejiga durante menos de 12 horas.

La presente exposición comprende métodos en los que el ADN en la muestra de orina se aísla sustancialmente antes de realizar el ensayo para la presencia de una secuencia de ADN fetal única presente en la muestra de orina. El aislamiento sustancial puede realizarse, aunque sin limitación, mediante precipitación y adsorción sobre una resina.

La presencia de una secuencia particular única de ADN fetal puede ser indicativa de una enfermedad genética.

En algunos casos, puede resultar deseable filtrar la muestra de orina para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes antes de la realización del ensayo. En una realización específica, la filtración extrae el ADN que comprende más de aproximadamente 1.000 nucleótidos.

5 La presente invención comprende además métodos para analizar una secuencia diana de ácidos nucleicos en orina, que comprenden: proporcionar una muestra de orina y realizar un ensayo de la muestra de orina para la presencia de una secuencia diana de ADN que ha cruzado la barrera renal.

10 La etapa de someter a ensayo para la presencia de una secuencia diana de ADN puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de hibridación, reacción de sonda cíclica, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismo de conformación de cadena sencilla, reacción en cadena de la ligasa, amplificación por desplazamiento de cadena y polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción. La etapa de someter a ensayo para la presencia de una secuencia diana de ADN puede comprender técnicas para amplificar el ADN diana.

15 En una realización, la secuencia diana de ADN comprende una secuencia génica alterada, y esta secuencia génica alterada puede comprender una alteración que se produce específicamente en células tumorales.

20 La presente invención comprende adicionalmente métodos que presentan la etapa de reducir la degradación del ADN en la muestra de orina previamente al ensayo de la muestra de orina para la presencia de una secuencia diana de ADN que ha cruzado la barrera renal. La reducción de la degradación del ADN puede realizarse mediante tratamiento con compuestos seleccionados de entre el grupo que consiste de: ácido etilendiaminatetraacético, HCl de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico. La degradación del ADN puede reducirse adicionalmente obteniendo una muestra de orina que se ha mantenido en la vejiga durante menos de 12 horas.

30 La presente invención comprende métodos en los que el ADN en la muestra de orina se aísla sustancialmente antes de realizar un ensayo para la presencia de una secuencia diana de ADN que ha cruzado la barrera renal. El aislamiento sustancial puede realizarse, aunque sin limitación, mediante precipitación y adsorción sobre una resina.

35 En algunos casos resulta deseable filtrar la muestra de orina para eliminar ácidos nucleicos contaminantes antes de realizar un ensayo para la presencia de una secuencia diana de ADN que ha cruzado la barrera renal. En una realización específica, la filtración elimina el ADN que comprende más de aproximadamente 1.000 nucleótidos.

40 La presente invención también comprende métodos para analizar una secuencia diana de ácidos nucleicos en orina, que comprende: proporcionar una muestra de orina que se sospecha que contiene ADN que ha cruzado la barrera renal, de un paciente; amplificar una secuencia diana de ADN en el ADN que ha cruzado la barrera renal, que comprende utilizar un cebador sustancialmente complementario a una parte de la secuencia diana de ADN que no se encuentra en células del tracto urinario del paciente con el fin de producir ADN diana amplificado; y detectar la presencia del ADN diana amplificado. La amplificación puede comprender realizar una reacción en cadena de polimerasa. La secuencia diana de ADN puede comprender una secuencia génica alterada, tal como una alteración que se produce en células tumorales.

45 La presente invención comprende además métodos que presentan la etapa de reducir la degradación del ADN en la muestra de orina antes de amplificar una secuencia diana de ADN en el ADN que ha cruzado la barrera renal. La reducción de la degradación del ADN puede realizarse mediante tratamiento con compuestos seleccionados de entre el grupo que consiste de: ácido etilendiaminatetraacético, HCl de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina, y dodecilsulfato sódico. La degradación del ADN puede reducirse adicionalmente mediante la obtención de una muestra de orina que se ha mantenido en la vejiga durante menos de 12 horas.

55 La presente invención comprende métodos en los que se aísla sustancialmente ADN en la muestra de orina antes de amplificar una secuencia diana de ADN en el ADN que ha cruzado la barrera renal. El aislamiento sustancialmente puede realizarse, aunque sin limitación, mediante precipitación y adsorción sobre una resina.

En algunos casos resulta deseable filtrar la muestra de orina para eliminar ácidos nucleicos contaminantes antes de amplificar una secuencia diana de ADN en el ADN que ha cruzado la barrera renal. En una realización específica, la filtración elimina el ADN que comprende más de aproximadamente 1.000 nucleótidos.

60 La presente exposición comprende adicionalmente un método para determinar el sexo de un feto, que comprende: obtener una muestra de orina que se sospecha que contiene ADN fetal masculino de una hembra gestante; amplificar una parte del ADN masculino presente en la muestra de orina mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando un cebador oligodesoxinucleótido que presente secuencias específicas para una parte del

cromosoma Y con el fin de producir ADN amplificado; y detectar la presencia del ADN amplificado.

5 La presente exposición comprende un kit diagnóstico para detectar la presencia de ADN fetal masculino humano en orina materna, que comprende: reactivos para facilitar el aislamiento de ADN a partir de orina; reactivos para facilitar la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa; una ADN polimerasa termoestable, y un oligodesoxinucleótido específico para una secuencia que únicamente se encuentra en el cromosoma Y.

10 Además, la presente exposición comprende cebadores oligonucleótidos para la amplificación de secuencias del cromosoma Y, que comprenden las secuencias SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4. Un kit para detectar ácidos nucleicos masculinos que también comprende dicha pareja de cebadores. La invención comprende además un método para detectar el ácido nucleico del cromosoma Y, que comprende: realizar una reacción en cadena de la polimerasa utilizando dichos cebadores y detectar el ácido nucleico del cromosoma Y amplificado.

15 También se dan a conocer sondas oligonucleótidas, incluyendo SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4, que pueden utilizarse para la detección de ácidos nucleicos masculinos.

20 La presente invención se basa en el nuevo descubrimiento de que el material genético de células en el cuerpo puede pasar a través de la barrera renal y aparecer en la orina de un mamífero en una forma suficientemente intacta para ser analizada. Además, el material genético de las células del embrión en desarrollo puede cruzar las barreras placentaria y renal y aparecer en la orina de la madre gestante. La presente exposición comprende métodos no invasivos de determinación del sexo fetal y/o el diagnóstico de enfermedades mediante la evaluación de una muestra de orina para la presencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos que han cruzado la barrera renal. Más específicamente la presente exposición comprende métodos para detectar secuencias fetales específicas de ácidos nucleicos mediante el análisis para la presencia de ácidos nucleicos fetales en la orina materna. Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para una diversidad de aplicaciones, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, las siguientes. Los métodos pueden utilizarse como técnicas diagnósticas para detectar la presencia de secuencias de ácidos nucleicos indicadores específicas, tales como secuencias del cromosoma Y o secuencias específica tumorales, con fines de diagnóstico precoz. Los métodos también pueden utilizarse para evaluar la eficacia del tratamiento de pacientes con determinados cánceres.

La presente invención comprende además nuevos cebadores, YZ1 e YZ2, para la utilización en técnicas de amplificación tal como se indica en el Ejemplo 3, posteriormente.

35 Los métodos de la presente invención ofrecen mejoras respecto a métodos anteriores de diagnóstico, detección y seguimiento debido a su naturaleza inherentemente no invasiva.

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen varios términos.

40 El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la transcripción de una secuencia de ARN. El término "genoma" se refiere al complemento génico completo de un organismo, contenido en un conjunto de cromosomas en los eucariotas.

45 Un gen o secuencia génica de "tipo salvaje" es la que se observa con mayor frecuencia en una población y, de esta manera, se hace referencia a ella de manera arbitraria como la forma "normal" o de "tipo salvaje" del gen. En contraste, el término "modificado", "mutante", "anomalía" o "alterado" se refiere a un gen, secuencia, o producto génico que manifiesta alteraciones de la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen, secuencia o producto génico de tipo salvaje. Por ejemplo, una secuencia alterada detectada en la orina de un paciente puede manifestar una alteración que se produce en las secuencias de ADN en células tumorales y que no se produce en las células normales (es decir, no cancerosas) del paciente. Se indica que resulta posible aislar los mutantes naturales; estos se identifican por el hecho de que presentan características alteradas en comparación con el gen o producto génico de tipo salvaje. Sin limitar la invención a la detección de ningún tipo específico de anomalía, las mutaciones pueden adoptar muchas formas, incluyendo la adición, la adición-delección, la delección, el desplazamiento de marco, la mutación con cambio de sentido, la mutación puntual, el desplazamiento del marco de lectura, la mutación inversa, las mutaciones de transición y de transversión, así como las alteraciones de microsatélites.

55 La expresión "anomalía genética asociada a una enfermedad" se refiere a un gen, secuencia o producto génico que manifiesta alteraciones de secuencia en comparación con el gen de tipo salvaje y que resulta indicativa de la propensión a desarrollar una enfermedad o de la existencia de la misma en el portador de la anomalía. Una anomalía genética asociada a una enfermedad abarca, aunque sin limitarse a ellas, las anomalías heredadas, así como las mutaciones de nueva aparición.

La expresión "secuencia de ADN únicamente fetal" se define como una secuencia de ácidos nucleicos que se encuentra presente en el genoma del feto pero no en el genoma materno.

Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" y "polimérico" referidos a un ácido nucleico son intercambiables y se refieren a que una molécula comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferentemente más de tres, y habitualmente más de diez. El tamaño exacto depende de muchos factores, que a su vez dependen de la función o utilización últimas del oligonucleótido. El oligonucleótido puede generarse de cualquier manera, incluyendo la síntesis química, la replicación del ADN, la transcripción inversa, o una combinación de los mismos.

Debido a que los mononucleótidos reaccionan para formar oligonucleótidos de manera que el fosfato 5' de un anillo de pentosa de un mononucleótido se une al oxígeno 3' del mononucleótido contiguo en una dirección a través de un enlace fosfodiéster, un extremo de un oligonucleótido se denomina "extremo 5'" si su fosfato 5' no se encuentra unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa de mononucleótido, y "extremo 3'" si su oxígeno 3' no se encuentra unido a un fosfato 5' de un anillo de pentosa del siguiente mononucleótido. Tal como se utiliza en la presente memoria, también puede decirse que una secuencia de ácidos nucleicos, incluso si es interna a un oligonucleótido de mayor tamaño, presenta extremos 5' y 3'.

Cuando dos oligonucleótidos diferentes no solapantes se hibridan con diferentes regiones de la misma secuencia lineal complementaria de ácidos nucleicos, y el extremo 3' de un oligonucleótido se encuentra orientado hacia el extremo 5' del otro, el primero puede denominarse oligonucleótido "de corriente arriba", y el último, oligonucleótido "de corriente abajo".

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se somete a condiciones bajo las que se inicia la extensión del cebador. Un "cebador" oligonucleótido puede ser de origen natural, tal como en un digerido de restricción purificado, o puede producirse sintéticamente.

Un cebador se selecciona para que resulte "sustancialmente" complementario a una cadena de secuencia específica de molde. El cebador debe ser suficientemente complementario para hibridarse con una cadena de molde para que se produzca el alargamiento del cebador. No resulta necesario que la secuencia de cebador refleje la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, puede unirse un fragmento de nucleótido no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador sustancialmente complementaria a la cadena. Las bases, o secuencias más largas, no complementarias pueden encontrarse distribuidas dentro del cebador, con la condición de que la secuencia del cebador presente suficiente complementariedad con la secuencia del molde para hibridarse con ella y de esta manera formar un complejo de molde-cebador para la síntesis del producto de extensión del cebador.

Un ácido nucleico "diana" es una secuencia de ácidos nucleicos a evaluar mediante hibridación, amplificación o cualquier otro medio de análisis de una secuencia de ácidos nucleicos, incluyendo una combinación de procedimientos de análisis.

Los procedimientos de "hibridación" implican la unión de una secuencia complementaria con el ácido nucleico diana (la secuencia a analizar). Es bien conocida la capacidad de dos polímeros de ácidos nucleicos con secuencias complementarias, de encontrarse e hibridarse entre sí mediante interacciones de apareamiento de bases. A las observaciones iniciales del proceso de "hibridación" por Marmur y Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:453, 1960, y de Doty *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:461, 1960, ha seguido el perfeccionamiento de este procedimiento hasta formar una herramienta esencial de la biología moderna. La hibridación abarca, aunque sin limitarse a ellas, las técnicas de hibridación en ranura, puntiforme y en filtros.

Resulta importante para algunas aplicaciones diagnósticas determinar si la hibridación representa una complementariedad completa o parcial. Por ejemplo, en el caso de que resulte deseable detectar simplemente la presencia o ausencia de ADN patogénico (tal como procedente de un virus, bacteria, hongo, micoplasma o protozoo), únicamente resulta importante que el método de hibridación garantice la hibridación en el caso de que las secuencias relevantes se encuentren presentes; pueden seleccionarse las condiciones para que puedan hibridarse tanto sondas parcialmente complementarias como sondas completamente complementarias. Sin embargo, otras aplicaciones diagnósticas pueden requerir que el método de hibridación distinga entre complementariedad parcial y completa. Puede resultar de interés detectar polimorfismos genéticos.

Los procedimientos que dan lugar al mismo nivel de hibridación con una complementariedad parcial y con complementariedad completa típicamente resultan inadecuados para dichas aplicaciones: la sonda se hibrida tanto con la secuencia normal como con la secuencia diana variante. La presente invención contempla que para algunos fines diagnósticos, la hibridación pueda combinarse con otras técnicas (tales como el análisis con enzimas de restricción). La hibridación, con independencia del procedimiento utilizado, requiere algún grado de comple-

mentariedad entre la secuencia que se analiza (la secuencia diana) y el fragmento de ADN utilizado para llevar a cabo el ensayo (la sonda) (evidentemente puede conseguirse la unión sin que exista complementariedad, pero este tipo de unión no es específico y debe evitarse).

5 El complemento de una secuencia de ácidos nucleicos, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácidos nucleicos de manera que el extremo 5' de una secuencia se aparea con el extremo 3' de la otra, se encuentra en "asociación antiparalela". Pueden incluirse en los ácidos nucleicos de la presente invención, bases específicas que no se encuentran con frecuencia en los ácidos nucleicos naturales, entre ellos, por ejemplo, la inosina y la 7-deazaguanina. No es necesario que la complementariedad sea perfecta: los dúplex estables pueden contener pares de bases incorrectamente apareados o bases no apareadas. Los expertos en la materia de la tecnología de los ácidos nucleicos pueden determinar la estabilidad del dúplex de manera empírica considerando varias variables, incluyendo, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y la secuencia del oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases incorrectamente apareados.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "Tm" se utiliza con referencia a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácidos nucleicos de doble cadena se ha disociado al 50% en cadenas simples. La ecuación para calcular la Tm de los ácidos nucleicos es bien conocida de la técnica. Tal como indican las referencias estándar, una estimación simple del valor de Tm puede calcularse mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$, cuando un ácido nucleico se encuentra en solución acuosa a NaCl 1 M (ver, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridisation, en: Nucleic Acid Hybridisation, 1985). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que consideran, además de la secuencia, características estructurales para el cálculo de la Tm.

25 El término "sonda" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), sea de origen natural, sea en un digerido de restricción purificado, o producido sintéticamente, que forma una estructura dúplex u otro complejo con una secuencia en otro ácido nucleico, debido a la complementariedad u otro medio de interacción atractiva reproducible, de por lo menos una secuencia en la sonda con una secuencia en el otro ácido nucleico. Las sondas resultan útiles para la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas particulares. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención se marque con cualquier "molécula informadora", de manera que resulte detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radioactivos y luminiscentes. Se contempla, además, que el oligonucleótido de interés (es decir, a detectar) se marque con una molécula informadora. También se contempla que se marque tanto la sonda como el oligonucleótido de interés. No se pretende que la presente invención se limite a ningún sistema particular de detección o marcaje.

40 El término "marcaje" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier átomo o molécula que puede utilizarse para proporcionar una señal detectable (preferentemente cuantificable), y que puede unirse a un ácido nucleico o a una proteína. Los marcajes proporcionan señales detectables por cualquiera de entre varios procedimientos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, la fluorescencia, la radioactividad, la colorimetría, la gravimetría, la difracción o absorción de rayos X, el magnetismo y la actividad enzimática.

45 La expresión "sustancialmente de cadena única" cuando se utiliza haciendo referencia a una diana de ácidos nucleicos significa que la molécula diana existe principalmente en forma de una cadena única de ácido nucleico, por oposición a una diana de doble cadena, que existe como dos cadenas de ácido nucleico que se mantienen unidas mediante interacciones de apareamiento de bases entre cadenas.

50 La expresión "variación de secuencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a diferencias en la secuencia de ácidos nucleicos entre dos cadenas de ácidos nucleicos de molde. Por ejemplo, un gen estructural de tipo salvaje y una forma mutante de este gen estructural de tipo salvaje pueden variar de secuencia por la presencia de sustituciones de una única base y/o por deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. Estas dos formas del gen estructural se dice que varían de secuencia una respecto a la otra. Puede existir una segunda forma mutante del gen estructural. Esta segunda forma mutante se dice que varía de secuencia respecto al gen de tipo salvaje y respecto a la primera forma mutante del gen.

60 Las expresiones "signatura de sondeo estructural", "signatura de hibridación" y "perfil de hibridación" se utilizan intercambiabilmente en la presente invención para indicar el nivel medido de formación de complejo entre un ácido nucleico diana y una sonda o conjunto de sondas, de manera que los niveles medidos son característicos del ácido nucleico diana cuando se comparan con los niveles de formación de complejo al utilizar dianas o sondas de referencia.

La expresión "cebadores oligonucleótidos que corresponden o son complementarios a una secuencia génica" se

refiere a cebadores oligonucleótidos capaces de facilitar la síntesis dependiente de molde de ácidos nucleicos de cadena única o de doble cadena. Los cebadores oligonucleótidos que corresponden o son complementarios con una secuencia génica pueden utilizarse en PCRs, PCR-RTs y similares.

5 La expresión "secuencia de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y fragmentos o partes de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que pueden ser de cadena sencilla o doble, y que representan la cadena sentido o antisentido.

10 El término "delección" se define como un cambio en la secuencia nucleótida o de aminoácidos en el que se encuentran ausentes uno o más nucleótidos o residuos aminoácidos.

Los términos "inserción" o "adición" se refieren al cambio en una secuencia nucleótida o de aminoácidos que ha resultado en la adición de uno o más nucleótidos o residuos aminoácidos, respectivamente, en comparación con las secuencias naturales.

15 Una "sustitución" resulta del cambio de uno o más nucleótidos o aminoácidos por nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, diferentes.

20 Una "alteración" en una secuencia de ácidos nucleicos se refiere a cualquier cambio en una secuencia de ácidos nucleicos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, una delección, una adición, una adición-delección, una sustitución, una inserción, una reversión, una transversión, una mutación puntual o una alteración de microsatélite.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "purificado", "descontaminado" y "esterilizado" se refieren a la eliminación de uno o más contaminantes de una muestra.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "sustancialmente purificado" y "sustancialmente aislado" se refieren a secuencias de ácidos nucleicos que se extraen de su ambiente natural, se aíslan o se separan, y que se encuentran libres preferentemente al 60 %, más preferentemente al 75 % y todavía más preferentemente al 90 %, de cualquier otro componente con el que se encuentran naturalmente asociados. Por lo tanto, un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido sustancialmente purificado. Se contempla que, para la puesta en práctica de los procedimientos de la presente invención, los polinucleótidos puedan purificarse sustancialmente, aunque ello no resulta necesario. Es conocida de la técnica una diversidad de procedimientos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos en forma no purificada.

35 Se define "amplificación" como la producción de copias adicionales de una secuencia de ácidos nucleicos y generalmente se lleva a cabo utilizando una reacción en cadena de polimerasa u otras tecnologías bien conocidas de la técnica (por ejemplo Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 1995). Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") se refiere al método de K.B. Mullis (patentes U.S. Nos. 4.683.195 y 4.683.202, incorporada en la presente memoria como referencia), que describe un método para incrementar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. Este procedimiento para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un amplio exceso de dos cebadores oligonucleótidos en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido de una secuencia exacta de ciclo térmico en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus cadena respectivas de la secuencia diana de doble cadena. Para realizar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza y los cebadores seguidamente se aparean a sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Tras el apareamiento, los cebadores se extienden con una polimerasa de manera que se forme una nueva pareja de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, apareamiento de cebadores y extensión con polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, desnaturalización, apareamiento y extensión constituyen un "ciclo"; pueden realizarse numerosos "ciclos"), con el fin de obtener una concentración elevada de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina a partir de las posiciones relativas mutuas de los cebadores, y por lo tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto de repetición del procedimiento, el método se denomina "reacción en cadena de la polimerasa" (en lo sucesivo, "PCR"). Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que han sido "amplificados por PCR".

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polimerasa" se refiere a cualquier enzima adecuado para la utilización en la amplificación de ácidos nucleicos de interés. Se pretende que el término abarque ADN polimerasas como la ADN polimerasa Taq, obtenida de *Thermus aquaticus*, aunque esta definición también abarca otras polimerasas, tanto termoestables como termolábiles.

Con la PCR, resulta posible amplificar una sola copia de una secuencia diana específica en el ADN genómico

- hasta un nivel que resulte detectable por varias metodologías diferentes (por ejemplo tinción, hibridación con una sonda marcada; incorporación de cebadores biotinilados seguido de la detección del conjugado avidina-enzima; incorporación de desoxinucleótidos trifosfato marcados con ³²P, tales como dCTP o dATP, en el segmento amplificado). Además del ADN genómico, también puede amplificarse cualquier secuencia oligonucleótida con el conjunto apropiado de moléculas cebadoras. En particular, los segmentos amplificados creados por el procedimiento de PCR mismo son, por sí mismos, moldes eficientes para amplificaciones posteriores por PCR. Las secuencias diana amplificadas pueden utilizarse para obtener segmentos de ADN (por ejemplo genes) para la inserción en vectores recombinantes.
- 5
- 10 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "producto de PCR" y "producto de amplificación" se refieren a la mezcla resultante de compuestos tras completar dos o más ciclos de las etapas de PCR de desnaturalización, hibridación y extensión. Estas expresiones abarcan el caso en el que se ha amplificado uno o más segmentos de una o más secuencias diana.
- 15 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada uno de los cuales corta ADN de doble cadena en las posiciones de una secuencia nucleótida específica o cerca de la misma.
- 20 Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "complementario" o "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, a una secuencia de nucleótidos) relacionados según las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se corresponden de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. Alternativamente, puede darse una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácidos nucleicos presenta efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácidos nucleicos. Ello resulta de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.
- 25
- 30 El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede darse una homología parcial o una homología completa (es decir, la identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una secuencia que inhibe por lo menos parcialmente la hibridación de una secuencia completamente complementaria con un ácido nucleico diana, y se denomina, utilizando el término funcional, "sustancialmente homóloga". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana puede examinarse utilizando un ensayo de hibridación (transferencia southern o northern, solución de hibridación y similares) bajo condiciones de baja astringencia. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá con la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia completamente homóloga con una diana, y de esta manera inhibirá dicha unión, bajo condiciones de baja astringencia. Ello no implica que las condiciones de baja astringencia permiten la unión no específica: las condiciones de baja astringencia requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede someterse a ensayo mediante la utilización de una segunda diana que carezca de incluso un grado parcial de complementariedad (por ejemplo una identidad inferior a aproximadamente el 30 %); en ausencia de una unión no específica, la sonda no hibridará con la segunda diana no complementaria.
- 35
- 40 Pueden utilizarse numerosas condiciones equivalentes que comprendan condiciones de baja o de alta astringencia; se consideran factores tales como la longitud y naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, que se encuentre presente en solución o inmovilizado, etc.) y la concentración de las sales y de otros componentes (por ejemplo la presencia o ausencia de formamida, de dextrán sulfato, de polietilenglicol), y la solución de hibridación puede variarse para generar condiciones de hibridación de baja o de alta astringencia diferentes, aunque equivalentes, a las condiciones anteriormente indicadas. El término "hibridación" tal como se utiliza en la presente memoria incluye "cualquier procedimiento por el que una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria a través de apareamiento de bases" (Coombs, Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, NY, 1994).
- 45
- 50 La "astringencia" típicamente se produce en un intervalo de entre aproximadamente T_m-5°C (5°C menos que la T_m de la sonda) y aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de T_m. Tal como entenderán los expertos en la materia, puede utilizarse una hibridación estricta para identificar o detectar secuencias polinucleótidas idénticas o para identificar o detectar secuencias polinucleótidas similares o relacionadas.
- 55
- 60 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "complejo de hibridación" se refiere a un complejo formado entre dos secuencias de ácidos nucleicos en virtud de la formación de puentes de hidrógeno entre bases G y C complementarias y entre bases A y T complementarias; estos puentes de hidrógeno pueden estabilizarse adicionalmente mediante interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias complementarias de ácidos nucleicos se unen por puentes de hidrógeno en una configuración antiparalela. Puede formarse un complejo de

hibridación en solución (por ejemplo análisis de C0t o de R0t) o entre una secuencia de ácidos nucleicos presente en solución y otra secuencia de ácidos nucleicos inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo una membrana de nilón o un filtro de nitrocelulosa, tales como los utilizados en las transferencias southern y northern, la transferencia puntiforme o un portaobjetos de vidrio, tal como se utiliza en la hibridación *in situ*, incluyendo la FISH (hibridación fluorescente *in situ*).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "antisentido" se utiliza con referencia a secuencias de ARN que son complementarias a una secuencia específica de ARN (por ejemplo ARNm) o de ADN. El ARN antisentido puede producirse mediante cualquier procedimiento, incluyendo la síntesis mediante corte-empalme del gen o genes de interés en una orientación inversa respecto a un promotor vírico que permite la síntesis de una cadena codificante. Tras introducirlo en una célula, esta cadena transcrita se combina con ARNm natural producido por la célula, formando dúplex. Estos dúplex seguidamente bloquean la transcripción adicional del ARNm o su traducción. De esta manera, pueden generarse fenotipos mutantes. La expresión "cadena antisentido" se utiliza en referencia a una cadena de ácidos nucleicos que es complementaria a la cadena "sentido". La designación (-) (es decir, la "negativa") en ocasiones se utiliza en referencia a la cadena antisentido, utilizando en ocasiones la designación (+) en referencia a la cadena sentido (es decir, la "positiva").

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se utiliza en su sentido más amplio. Una muestra biológica de la que se sospeche que contiene ácidos nucleicos puede comprender, aunque sin limitarse a ellos, ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido, tal como para análisis de transferencia southern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido), y similares.

La expresión "tracto urinario" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a órganos y conductos que participan en la secreción y eliminación de la orina del cuerpo.

APLICACIONES DE LOS MÉTODOS DE LA PRESENTE EXPOSICIÓN

La presente exposición puede utilizarse para muchas aplicaciones, incluyendo, aunque sin limitar en modo alguno la invención, las siguientes.

A. Análisis para la presencia de ácidos nucleicos fetales en orina materna.

Se proporcionan métodos de análisis para la presencia de secuencias fetales específicas de ácidos nucleicos mediante la detección de secuencias fetales específicas de ácidos nucleicos que han cruzado las barreras placentaria y renal y que se encuentran presentes en la orina materna. Los métodos de manera general implican las etapas de obtener una muestra de orina de una mujer gestante y someter el material a un método para detectar una secuencia fetal específica de ácidos nucleicos de interés. En una realización, el método comprende además purificar sustancialmente los ácidos nucleicos presentes en la muestra de orina previamente a la detección de las secuencias específicas de ácidos nucleicos de interés. Estos métodos presentan una diversidad de aplicaciones diagnósticas, incluyendo la determinación del sexo del feto y la identificación de enfermedades genéticas fetales, tales como aquéllas heredadas del padre, con diversos fines, incluyendo determinaciones de paternidad.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse, por ejemplo, para diagnosticar cualquiera de entre más de 3.000 enfermedades genéticas conocidas en la actualidad o que se identificarán en el futuro (por ejemplo hemofilias, talasemias, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y fibrosis quística). Cualquier enfermedad genética para la que la mutación o mutaciones y la secuencia de nucleótidos circundante sea conocida puede identificarse mediante métodos de la presente invención.

Además, existe evidencia creciente de que algunas secuencias de ADN pueden predisponer a un individuo a cualquiera de entre varias enfermedades, tales como diabetes, arterioesclerosis, obesidad, diversas enfermedades autoinmunitarias y cáncer (por ejemplo colorrectal, mamario, ovárico o pulmonar), o a una anomalía cromosómica (prenatal o postnatalmente). El diagnóstico de una enfermedad genética, aneuploidia cromosómica o predisposición genética puede realizarse prenatalmente mediante la recolección de orina de la madre gestante.

B. Análisis para la presencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos del huésped que cruzan la barrera renal.

Se proporcionan métodos que permiten la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos que se originan a partir de los propios ácidos nucleicos endógenos del paciente que deben cruzar la barrera renal y aparecen en la orina. El método generalmente implica las etapas de obtener una muestra de orina de un paciente y someter el material a un método para detectar una secuencia diana de ácidos nucleicos. En una realización, el método comprende además purificar sustancialmente ácidos nucleicos presentes en la muestra de orina previamente a la detección del ácido nucleico diana. Este método presenta una diversidad de aplicaciones diagnósti-

cas, incluyendo, aunque sin limitación, el diagnóstico de tumores y el diagnóstico de enfermedades causadas por la expansión clonal de células que contienen alteraciones del ADN acompañadas de la muerte de por lo menos un subconjunto de las células que portan alteraciones de ADN.

5 **C. Análisis para la presencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos que no son del huésped y que cruzan la barrera renal.**

La presente invención proporciona métodos que permiten la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos que no se originan a partir de las secuencias de ácidos nucleicos endógenas del paciente, y deben cruzar la barrera renal y aparecen en la orina. Las etapas son las mismas que para la detección de ácidos nucleicos originados en el huésped, excepto en que el método de detección selecciona secuencias de ácidos nucleicos que no son del huésped. Este método presenta una diversidad de aplicaciones diagnósticas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, el diagnóstico de infección por patógenos que contienen ácidos nucleicos que infectan áreas que no son del tracto urinario, y que no liberan ácidos nucleicos directamente en el tracto urinario.

15 **II. MÉTODOS PARA LA MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos que resultan útiles para la práctica de la presente invención se describen en una diversidad de referencias, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición, vols. 1 a 3, editores Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, y *Current Protocols in Molecular Biology*, editores Ausubel *et al.*, Greene Publishing y Wiley-Interscience: New York, 1987, y actualizaciones periódicas. Las descripciones específicas, aunque no pretenden limitar el alcance de la presente invención, pueden proporcionar una guía en la práctica de determinados aspectos de la presente invención.

25 **A. Reducción de la degradación por ADNasa**

El ADN se encuentra sometido a degradación por las ADNasa presentes en la orina. La presente invención comprende varios métodos para impedir o reducir la degradación del ADN mientras se encuentra en la orina, de manera que se encuentren disponibles secuencias suficientemente largas para la detección mediante métodos conocidos de detección de ADN tales como los descritos posteriormente. En una realización, se obtienen muestras de orina que se ha mantenido en la vejiga durante menos de 12 horas; en una realización específica, la orina se mantiene en la vejiga durante menos de 5 horas, más preferentemente durante menos de 2 horas. La recolección y análisis de una muestra de orina antes de que se haya mantenido en la vejiga durante un periodo de tiempo prolongado reduce la exposición del ADN a cualquier ADNasa presentes en la orina.

En otra realización de la presente invención, tras la recolección, la muestra de orina se trata utilizando uno o más métodos de inhibición de la actividad de ADNasa. Entre los métodos de inhibición de la actividad de ADNasa se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la utilización de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), HCl de guanidina, GITC (isotiocianato de guanidina), N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato sódico (SDS), una concentración salina elevada y la inactivación por calor de la ADNasa.

En todavía otra realización, tras la recolección, la muestra de orina se trata con un adsorbente que atrapa el ADN, después de lo cual el adsorbente se extrae de la muestra, se enjuaga y se trata para liberar el ADN atrapado para su detección y análisis. Este procedimiento no sólo aísla el ADN de la muestra de orina sino que, cuando se utiliza con algunos adsorbentes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, las membranas Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Piscataway, NJ) protege al ADN de la degradación por la actividad ADNasa.

50 **B. Incremento de la sensibilidad de detección**

En algunos casos, la cantidad de ADN en una muestra de orina es limitada. Por lo tanto, para determinadas aplicaciones, la presente invención abarca realizaciones en las que se incrementa la sensibilidad de detección mediante cualquiera/cualesquiera de los procedimientos conocidos de la técnica, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, uno o más de los procedimientos siguientes.

55 Cuando el ADN se encuentra presente en cantidades minúsculas en la orina, pueden recogerse muestras mayores de orina y después concentrarse mediante cualquier medio que no afecte a la detección del ADN presente en la muestra. Entre algunos ejemplos se incluyen, aunque sin limitar el alcance de la invención, reducir la cantidad de líquido presente en la muestra mediante concentración con butanol o concentración con Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

60 Puede utilizarse la PCR anidada para mejorar la sensibilidad en varios órdenes de magnitud. Debido a la vulnerabilidad de la PCR anidada a los resultados inexactos debido a la contaminación del ADN, en una realización de

la presente invención se adoptan precauciones para evitar la contaminación del ADN de la muestra. Por ejemplo, sin limitar la presente invención, pueden tratarse los reactivos de PCR con una o más endonucleasas de restricción que corten dentro de la secuencia diana, previamente a su adición a la muestra de ensayo de ADN.

5 C. Purificación sustancial de los ácidos nucleicos previamente a su detección

En una realización, la presente invención abarca la purificación o aislamiento sustancial de los ácidos nucleicos de una muestra previamente a su detección. Las moléculas de ácido nucleico pueden aislarse de la orina utilizando cualquiera de entre varios procedimientos, que son bien conocidos de la técnica. Resulta aceptable cualquier procedimiento para el aislamiento que facilite la detección del ácido nucleico diana. Por ejemplo, puede aislarse el ADN mediante precipitación, tal como describen Ishizawa *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:5972, 1991. En el caso de una muestra de gran volumen que contiene una concentración baja de ADN, tal como la orina, se incluye un procedimiento preferente para el aislamiento del ADN. En este procedimiento, se trata una muestra con un adsorbente que actúa concentrando el ADN. Por ejemplo, puede tratarse la muestra con un material sólido que adsorba ADN, tal como, aunque sin limitarse a ellos, DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), un filtro de ADN y/o resina de sílice glassmilk. La muestra de ADN se eluye del adsorbente tras el lavado de las otras composiciones.

Considerando la sensibilidad de las diversas técnicas de análisis de ácidos nucleicos, tales como PCR, la presente invención también abarca procedimientos para la reducción de la presencia de ácidos nucleicos contaminantes en la muestra de orina. Las muestras de orina pueden contaminarse con secuencias de ácidos nucleicos que no han cruzado la barrera renal procedentes del desprendimiento de células del revestimiento del tracto urinario, mediante una relación sexual, o durante el procesamiento de la muestra de orina previamente a la detección de la secuencia de ADN de interés. Sin pretender limitar la presente invención a ningún mecanismo, se cree que el ADN que atraviesa la barrera renal y aparece en la orina de media probablemente presenta una longitud menor que el ADN introducido desde fuentes contaminantes debido a la fragmentación que se produce en las células apoptóticas y en las células necróticas en el cuerpo, en combinación con la acción de la ADNasa en la sangre y en la orina.

Puede utilizarse la filtración para reducir el nivel de ADN contaminante en una muestra de orina previamente a la detección, mediante la selección de secuencias más cortas de ADN. En una realización de la presente invención, los ácidos nucleicos que contienen más de 1.000 pares de bases, o 1.000 nucleótidos cuando se han desnaturado, se eliminan de la muestra previamente a la detección. En una realización específica de la presente invención, las muestras de orina se filtran previamente a la amplificación por PCR con el fin de eliminar sustancialmente todo el ADN que comprenda más de 300 pares de bases, o 300 nucleótidos si se encuentra desnaturado. Sin limitar la invención a ningún mecanismo específico, se propone que esta filtración elimina el ADN contaminante de las células desprendidas de la pared uretral/de la vejiga o introducidas en la uretra durante una relación sexual. La mayoría del ADN de estas fuentes contaminantes es probable que comprenda más de 300 nucleótidos, debido a que el ADN no es mayoritariamente un producto de la fragmentación de los ácidos nucleicos como resultado de la muerte celular apoptótica.

Las moléculas de ácidos nucleicos también pueden aislarse mediante electroforesis en gel, de manera que se separan los fragmentos de ácido nucleico según peso molecular. La técnica del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) es aplicable a procedimientos de separación por electroforesis, seguido de la detección de los ácidos nucleicos que permite la comparación por peso molecular de los fragmentos de dos o más alelos de una secuencia génica específica.

Los procedimientos anteriormente indicados de purificación pretenden describir, pero no limitar, los procedimientos que resultan adecuados para su utilización en la invención. Los procedimientos para aislar ácidos nucleicos se encuentran dentro de los conocimientos de un experto en la materia y no se describen en detalle en la presente memoria.

D. Análisis y detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos

La expresión "ensayo para la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a la utilización de cualquier procedimiento para determinar si una secuencia de ácidos nucleicos se encuentra o no presente en una muestra. Entre los procedimientos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las técnicas de hibridación, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Un experto en la materia dispone de acceso a una multitud de estos procedimientos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, aquellos indicados en *Current Protocols in Molecular Biology*, editores Ausubel *et al.*, Greene Publishing y Wiley-Interscience: New York, 1987, y actualizaciones periódicas. Se contempla que puedan utilizarse dos o más procedimientos en combinación para confirmar los resultados o mejorar la sensibilidad del ensayo. Un ejemplo de análisis mediante la combinación de procedimientos para determinar si se encuentra presente o no una secuencia de ácidos nucleicos es la técnica del polimorfismo de

longitud de fragmentos de restricción basada en PCR ("RFLP-PCR"), en la que las secuencias de ácidos nucleicos se amplifican, se tratan con enzimas de restricción, y se separan mediante electroforesis, permitiendo la detección de ácidos nucleicos que contienen pequeñas alteraciones, tales como mutaciones puntuales.

5 El término "detectar" en relación a una secuencia de ácidos nucleicos se refiere a la utilización de cualquier procedimiento para observar o determinar señales que indican la presencia de la secuencia diana de ácidos nucleicos en una muestra. Pueden combinarse procedimientos de detección con procedimientos de marcaje de los ácidos nucleicos con el fin de proporcionar una señal mediante, por ejemplo: fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X o adsorción, magnetismo, actividad enzimática y similares. De esta
10 manera, la señal puede detectarse, mediante procedimientos apropiados al tipo de señal, con el fin de determinar la presencia o ausencia de la secuencia específica del ADN de interés.

Las secuencias específicas de ADN pueden "amplificarse" de varias maneras, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la reacción cíclica de sondeo (Bekkaoui, F. *et al.*, BioTechniques 20:240-248, 1996), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR anidada, PCR-SSCP (polimorfismo de conformación de cadena única), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (F. Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-93, 1991), clonación, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (G.K. Terrance Walker *et al.*, Nucleic Acids Res. 22:2670-77, 1994) y variaciones, tales como la amplificación específica de alelos (ASA).

20 Una alternativa a la amplificación de una secuencia específica de ADN que puede utilizarse para indicar la presencia de dicha secuencia en procedimientos de la presente invención se basa en la hibridación de una estructura de corte de ácidos nucleicos con la secuencia específica, seguido del corte-empalme de la estructura de corte de una manera específica de sitio. Este procedimiento se denomina en la presente memoria "detección de productos de corte". Este procedimiento se describe en detalle en las patentes U.S. Nos. 5.541.331 y 5.614.402, y
25 en las publicaciones PCT Nos. WO 94/29482 y WO 97/27214. Permite la detección de cantidades reducidas de secuencias específicas de ácidos nucleicos sin amplificar la secuencia de ADN de interés.

A continuación se proporciona una descripción meramente a título de ejemplo haciendo referencia a los dibujos adjuntos de realizaciones de la presente invención. En los dibujos:

30 La figura 1A es una fotografía de un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, que ilustra la detección de ADN polimérico en muestras de orina obtenidas de ratones en los que se ha inyectado ADN de fago λ . Se presentan los resultados de dos experimentos (carriles 1 y 2).

35 La figura 1B es una autorradiografía de un gel de agarosa que ilustra la detección de ADN de fago λ marcado con ^{32}P en la orina de ratones en los que se ha inyectado ADN fágico. Se presentan los resultados de dos experimentos (carriles 1 y 2).

40 La figura 2 es una fotografía de un gel de agarosa que ilustra la detección mediante electroforesis en gel de secuencias de ADN de células de linfoma de Raji procedentes de orina de ratones preinoculados con células humanas irradiadas. Carriles: 1 - ADN de orina procedente de ratones de control; 2 - ADN humano de control; 3 - ADN de orina de ratones en los que se inyectaron células humanas.

45 La figura 3 es una fotografía de un gel de agarosa que ilustra la detección de secuencias específicas del cromosoma Y de ADN procedente de orina de una mujer que había recibido la transfusión de sangre de un varón 10 días antes. Carriles: 1 - marcadores (ADN de pBR322-digerido con MspI); 2 - control positivo (0,1 μ g de ADN total de linfocitos de un donante varón); 3 - muestra de blanco (solución salina que había pasado todos los procedimientos de aislamiento y análisis del ADN); 4 - control negativo (sin ADN añadido); 5 - ADN de orina tras la transfusión de sangre.

50 La figura 4A es una fotografía de un gel de agarosa que ilustra la detección, en la orina de mujeres gestantes con fetos masculinos, de un fragmento de 154 pares de bases de la secuencia de ADN repetido específica del cromosoma Y. Carriles: M - estándar de peso molecular; I - control negativo (sin ADN añadido); 2 a 5 - controles positivos (0,1, 1,0, 10 y 100 pg de ADN total de varón, respectivamente); 6 y 8 - fetos masculinos; 7 - feto femenino; 9 - muestra de blanco; 10 - ADN de orina procedente de mujer no gestante.

60 La figura 4B es una fotografía de un gel de agarosa que ilustra la detección, en la orina de mujeres gestantes con fetos masculinos, de un fragmento de 97 pares de bases de secuencias de ADN repetido específico del cromosoma Y. Carriles: M - estándar de peso molecular; 1-3 - controles positivos (0,1, 10 y 100 pg de ADN total de varón, respectivamente); 4 y 5 - fetos femeninos; 6 y 7 - fetos masculinos; 8 - muestra de blanco; 9 - ADN de orina procedente de mujer no gestante.

La figura 5 es una fotografía de un gel de agarosa que ilustra la detección de una secuencia de ADN de una sola copia específico del cromosoma Y (198 pares de bases) en la orina de mujeres gestantes con fetos masculinos. Carriles: M - estándar de peso molecular; 1 - control negativo (sin ADN añadido); 2-5 - controles positivos (1, 10, 100 y 1.000 pg de ADN total de varón, respectivamente); 6 y 7 - fetos masculinos; 8 - feto femenino; 9 - muestra de blanco; 10 - ADN de orina procedente de mujer no gestante.

La figura 6 es una fotografía de un gel de agarosa que ilustra la cinética de degradación del ADN durante el tiempo como resultado de la actividad de ADNasa endógena en la orina, en la que los carriles contienen lo siguiente: carril 1 - control positivo (200 pg de ADN de fago λ añadido al tubo de PCR); carriles 2-5 - muestras incubadas durante 0, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos, respectivamente.

La figura 7 es una autorradiografía de una membrana de sonda Zeta que ilustra la detección, mediante hibridación, de secuencias de ADN específicas del cromosoma Y en muestras de orina procedente de mujeres gestantes. Carriles: 1 - control negativo (hembra no gestante); 2 - control positivo (ADN genómico total de varón, 5 ng); 3,4 fetos masculinos; 5,6- fetos femeninos.

Las figuras 8A, 8B y 8C son fotografías de geles de agarosa que comparan el ADN fetal a ADN de orina materna en edades de gestación de aproximadamente 7 a 8 semanas. La figura 8A representa el ADN fetal; la figura 8B representa el ADN de orina materna preparado mediante simple dilución 10 veces de la orina, y la figura 8C representa ADN de orina materna preparado mediante adsorción en GEAE Sephadex A-25. M - varón; f - femenino.

La figura 9 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el efecto sobre la PCR de la adsorción de ADN de orina sobre filtros Hybond N bajo diversas condiciones. Carriles 1 a 4: se añadieron 20 fg, 1 pg, 2 pg ó 10 pg de ADN de varón por cada 1 µl de orina femenina. Control - se introdujeron alícuotas de 10 µl de orina diluida 10 veces directamente en tubos para PCR. Otras muestras de orina se concentraron en solución salina (10 x SSC) o alcalina (ajustada a pH 12 con NaOH) y se manipularon mediante el método de "transferencia en filtro". nc - control negativo; m - estándar de peso molecular.

Las figuras 10A, 10B y 10C son fotografías de un gel de agarosa que muestran el efecto de la adsorción de ADN de orina utilizando filtros Hybond N sobre la degradación del ADN. A - control (carriles: 1 - se introdujo una alícuota de 10 µl de orina diluida 10 veces directamente en tubos par PCR inmediatamente después de la adición de ADN de varón; 2 - se introdujo una alícuota de 10 µl de orina diluida 10 veces directamente en tubos para PCR tras la incubación durante la noche a temperatura ambiente; 3 - se incubó un filtro Hybond N en orina durante la noche y se utilizó para la transferencia en filtro del ADN (para el análisis se utilizó una alícuota de 10 µl de eluido del filtro). B - todos los procedimientos igual que en A, excepto en que las muestras de orina se diluyeron a 10 mM en EDTA. C- todos los procedimientos igual que en C, excepto en que las muestras de orina se diluyeron a 10 mM en EDTA y se ajustaron a pH 12.

EJEMPLO 1

DETECCIÓN DE ADN POLIMÉRICO EN ORINA DE RATONES PREINOCULADOS CON ADN DE FAGO λ

Este ejemplo analiza la capacidad del ADN de cruzar la barrera renal en roedores y de aparecer en forma detectable en la orina.

El ADN del fago λ (New England BioLabs, MA) se marcó mediante desplazamiento de mellas con ADN dNTP [α -³²P] (New England BioLabs, MA) utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* a una radioactividad específica de 10⁸ cpm/µg, tal como se ha descrito anteriormente (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Se inyectaron subcutáneamente ratas Wistar macho de dos meses de edad con 0,4 µg de ADN marcado con [³²P]. A continuación, se recogieron muestras de orina durante tres días y se midió la radioactividad total y la radioactividad insoluble en ácido en un contador de centelleo líquido. En la Tabla 1, posteriormente, se muestra la cinética de excreción de la radioactividad insoluble en ácido en la orina. Se determinó que el 3,2 % del ADN total con el que se habían inoculado las ratas cruzaba la barrera renal y se detectaba en la orina, y el 0,06 % del ADN total aparecía en la orina en una forma insoluble en ácido, representando los nucleótidos poliméricos.

60 TABLA 1
CINÉTICA DE LA EXCRECIÓN DE ORINA DE [³²P]-ADN INYECTADO

	1º día	2º día	3º día	TOTAL
RADIOACTIVIDAD TOTAL (CPM) (% DEL ADN INYECTADO)	1.080.800 (2,9 %)	100.800 (0,3 %)	7.700 (0,02 %)	1.189.300 (3,2 %)

RADIOACTIVIDAD INSOLUBLE EN ÁCIDO (CPM) (% DEL ADN INYECTADO)	21.000 (0,06 %)	SD*	SD	21.000 (0,06 %)
---	-----------------	-----	----	-----------------

*SD: sin datos.

5 El ADN procedente de muestras de orina se aisló mediante desproteínización en fenol (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) para la visualización del ADN (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

10 Las figuras 1A y 1B ilustran los resultados de experimentos dobles (representados por los carriles 1 y 2). La figura 1A es el gel observado mediante tinción con bromuro de etidio, y la figura 1B representa el mismo gel visto mediante autorradiografía. Los fragmentos marcados de ADN aparecieron en la autorradiografía, representando las secuencias con una media de aproximadamente 150 pares de bases.

15 Los resultados de este experimento apoyan que el ADN puede cruzar tanto la barrera renal en forma polimérica, como permanecer en forma polimérica en la orina, a pesar de la presencia de ADNasas, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la obtención de una muestra de orina y el aislamiento del ADN de la misma. La cinética de la excreción del ADN inyectado sugiere que mucho del ADN inyectado resulta reutilizado en el cuerpo previamente a su aparición en la orina. Resulta posible que los nucleótidos marcados radiactivamente y reciclados se incorporen después en las células del tracto urinario y aparezcan en la orina sin cruzar la barrera renal. Sin embargo, es improbable que el ADN detectado en este experimento se haya introducido en la orina desde las células del tracto urinario, debido al corto periodo de tiempo entre la inyección del ADN marcado y la recolección de la orina. Aunque el ADN inyectado puede aparecer finalmente en células de la vejiga, resulta improbable que represente la misma secuencia de ácido nucleico debido a que es previsible que la acción de nucleasas en el cuerpo tras un periodo de tiempo suficiente de encontrarse dicho ácido nucleico fuera de las células en el cuerpo, degraden finalmente el ADN hasta nucleótidos.

EJEMPLO 2

30 **DETECCIÓN DE SECUENCIAS HUMANAS DE ADN EN ORINA DE RATÓN PREINOCULADO CON CÉLULAS HUMANAS**

El Ejemplo 1 ha demostrado que las secuencias de ADN pueden permanecer en forma polimérica en el flujo sanguíneo, cruzar la barrera renal y seguir siendo adecuadas para su detección posterior. El siguiente conjunto de experimentos se llevó a cabo con el fin de determinar si podía detectarse en la orina el ADN de células que se encontrasen moribundas en el organismo pero no en el tracto urinario.

40 Se irradiaron con 1.000 rads de rayos γ procedente de ¹³⁷Cs, células de linfoma de Raji humano cultivadas en RPMI suplementado con suero de feto bovino al 5 %. A continuación, los ratones se inocularon subcutáneamente con 10⁸ células cada uno. Se recogieron muestras de orina durante tres días, y se aisló el ADN tal como se ha descrito anteriormente. Se detectaron secuencias de ADN específicas del ser humano mediante cribado multilocus utilizando PCR dirigida por oligonucleótido *Alu*, tal como se ha descrito anteriormente (Zietkiewicz E., Labuda M., Sinett D., Glorieux F.H., Labuda D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8448-8451, 1992) seguido de electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %.

45 Se muestran los resultados en la figura 2. La amplificación por PCR del ADN en orina procedente del animal de control (carril 1) no produjo ningún fragmento de ADN; y los fragmentos obtenidos a partir de la amplificación por PCR del ADN en la orina obtenida del ratón de ensayo que había sido inyectado con células humanas (carril 3) no contenían secuencias detectables de ADN humano, como pone de manifiesto una comparación con bandas idénticas que aparecen en la muestra de ADN humano de referencia (carril 2).

50 Los resultados apoyan que una parte del ADN de células moribundas en un mamífero cruza la barrera renal y permanece en forma polimérica en la orina, a pesar de la presencia de ADNasas, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la obtención de una muestra de orina y el aislamiento del ADN a partir de la misma. Además, puede ensayarse para la presencia de secuencias específicas de ADN en muestras de orina utilizando procedimientos tales como la amplificación por PCR de secuencias específicas deseadas que no se encontrarían presentes en la muestra de orina si no hubiesen cruzado la barrera renal en forma amplificable.

EJEMPLO 3

60 **DETECCIÓN DE ADN QUE HA CRUZADO LA BARRERA RENAL Y QUE APARECE EN LA ORINA HUMANA**

Conjuntamente, los Ejemplos 1 y 2 demuestran que, en el modelo ratón, tanto el ADN libre como el ADN de células moribundas, cruza la barrera renal y puede detectarse en la orina mediante análisis de PCR. Se seleccionaron dos sistemas como modelos para demostrar que el ADN puede cruzar la barrera renal y permanecer en forma polimérica en muestras de orina humana. Los sistemas están diseñados para centrarse en ADN que se origina en células moribundas fuera del tracto urinario, y no en ADN que aparece en la orina debido a la muerte de células en el tracto urinario.

Se estudiaron mujeres embarazadas o que habían recibido una transfusión de sangre de varón, debido a que los dos modelos indicados representan seres humanos con ADN en sus cuerpos que no se encuentra presente en su genoma normal. Se analizó cada mujer en el estudio para la presencia de secuencias específicas del cromosoma Y en la orina.

Detección de secuencias repetidas y de copia única específicas del cromosoma Y en la orina de mujeres embarazadas con fetos varones

Tal como se ha comentado anteriormente, la muerte celular apoptótica desempeña un papel significativo en la embriogénesis. Si el ADN fetal cruza la barrera placentaria, aparecerá en la sangre de la madre y, después, en su orina. Los reticulocitos y glóbulos blancos fetales son otras fuentes potenciales de ADN fetal y también se detectan en la sangre de la madre en las primeras 4 a 5 semanas de embarazo (Lo Y-M.D. *et al.*, *Lancet* 335:1463-1464, 1990; Bianchi D.W. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3279-3283, 1990; Bianchi D.W. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:705-708, 1996).

Se obtuvieron muestras de orina de mujeres embarazadas en edades gestacionales de entre 16 y 36 semanas. Se confirmó el sexo fetal mediante exploración de ultrasonidos. En estudios anteriores, descritos en el Ejemplo 4, posteriormente, se descubrió que la orina humana contiene componentes que pueden degradar el ADN (ADNasa). Esta actividad ADNasa varía de muestra a muestra. Para reducir la degradación del ADN, se adoptaron las etapas siguientes para recoger y conservar las muestras de orina. Se introdujeron las muestras de orina (de 20 ml cada una) en tubos de Corning de 50 ml que contenían 5 ml de solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 250 mM como profiláctico contra la actividad ADNasa. Los tubos que contenían las muestras de orina se mantuvieron seguidamente a -80°C hasta su utilización.

Se utilizaron dos procedimientos para el aislamiento del ADN de las muestras de orina, proporcionando ambos esencialmente los mismos resultados. En el primer procedimiento, descrito anteriormente por Ishizawa *et al.* (Ishizawa M. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:5972, 1991), se descongelaron muestras de orina (150 µl) a 60°C y se añadieron a 3 volúmenes de una solución que contenía isotiocianato de guanidina (GITC) 6 M, EDTA 13 mM, N-lauroilsarcosina sódica al 0,5 %, 10 µg de glucógeno y Tris-HCl 26 mM, pH 8. La mezcla se incubó a 60°C durante 15 minutos en un bloque de calentamiento y se precipitó el ADN mediante adición de un volumen igual de isopropanol. Tras la agitación vigorosa, se mantuvieron los tubos herméticamente cerrados durante 15 minutos a temperatura ambiente y el ADN se recogió mediante centrifugación a 10.000 x g durante 5 minutos. El pellet resultante se lavó con etanol al 80 %, se secó al aire, se disolvió en 50 µl de agua desionizada y se trató con reactivo de extracción de ADN basado en Chelex 100 (Perkin Elmer), según se describe (Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R., *BioTechniques* 10:506-513, 1991).

La presente invención abarca un procedimiento alternativo de aislamiento del ADN que resulta adecuado para el aislamiento de ADN de muestras de mayor tamaño. En este procedimiento, basado en la adsorción del ADN sobre vidrio en polvo, se añadieron muestras de orina de 2,5 ml a un volumen igual de HCl de guanidina 10 M, y la mezcla se aplicó a una columna con 0,1 ml de resina Wizard al 5 % (sistema de purificación de ADN Wizard Minipreps, Promega). Las columnas se lavaron con una solución que contenía NaCl 100 mM en una solución de etanol al 50 % y el ADN se eluyó con 100 µl de agua desionizada.

Las muestras de ADN purificadas a partir de orina se desnaturalizaron por calor durante 5 minutos a 95°C, seguido de la filtración a través de un filtro Microcon 100 (Amicon, MA) según recomendaciones del fabricante, con el fin de separar de la muestra sustancialmente todo el ADN de longitud superior a 300 nucleótidos.

A continuación, las muestras se sometieron a PCR. Cada experimento presentaba controles internos positivos y negativos, así como una muestra de blanco (solución salina procesada de la misma manera que las muestras de orina), diseñados para detectar la contaminación de la PCR.

Para reducir la probabilidad de contaminar por arrastre el ADN de la mezcla de reacción de PCR, los reactivos se descontaminaron previamente a la adición de la muestra de ADN mediante incubación con una endonucleasa de restricción específica para la secuencia diana: HinfI - para la secuencia de 97 pares de bases específica del cromosoma Y, y HaeIII para la secuencia de 154 pares de bases. Los reactivos se trataron durante 1 hora a 37°C con 1 unidad por cada 25 µl de mezcla de reacción. A continuación, las muestras de PCR se introdujeron en una

celda termocicladora, se calentaron a 94°C durante 3 minutos para inactivar el enzima y se añadieron las muestras de ADN.

5 Se utilizaron dos marcadores diferentes para detectar las secuencias específicas del cromosoma Y. DYZ1 es una secuencia repetida (2.000-5.000 veces por genoma) descrita por Nakahori Y. *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:7569-7580, 1986. También se utilizó el marcador génico de copia única DYS14 para examinar la capacidad de los procedimientos de la presente invención de detectar alteraciones en genes de copia única, tal como ocurre en determinados trastornos genéticos y cánceres (Arnemann J. *et al.*, Nucl. Acids Res. 15:8713-8724, 1987). Se analizó la secuencia de copia única mediante PCR anidada, una técnica de PCR más sensible y específica (Lo Y-M. D. *et al.*, Lancet 335:1463-1464, 1990).

Se utilizaron los cebadores siguientes para amplificar los fragmentos DYZ1:

15 (Y1) 5'-TCCACTTTATTCCAGGCCTGTCC (SEC ID nº 1)
 (Y2) 5'-TTGAATGGAATGGGAACGAATGG (SEC ID nº 2)
 (YZ1) 5'-CCATTCTTTGCATTCCGTTTCC (SEC ID nº 3)
 (YZ2) 5'-ATCGACTGGCAGGGAACCAAAG (SEC ID nº 4)

20 Para detectar DYS14 los presentes inventores llevaron a cabo una PCR anidada utilizando los cebadores siguientes:

25 (Y1.5) 5'-CTAGACCGCAGAGGCGCCAT (SEC ID nº 5)
 (Y1.6) 5'-TAGTACCCACGCCTGCTCCGG (SEC ID nº 6)
 (Y1.7) 5'-CATCCAGAGCGTCCCTGGCTT (SEC ID nº 7)
 (Y1.8) 5'-CTTTCCACAGCCACATTTGTC (SEC ID nº 8)

Y1 y Y2 resultan en un producto de 154 pares de bases (Ivinson A.J., Taylor G.R., en: PCR. A practical approach (editores: McPherson M.J., Quirke P. y Taylor G.R.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, paginas 15-27, 1993).

30 Se cree que segmentos más cortos de ADN son más prevalentes en las muestras de orina que los segmentos más largos debido a la filtración por la barrera renal y a la acción de la ADNasa. La presente invención abarca los nuevos cebadores YZ1 y YZ2, que generan un fragmento más corto (97 pares de bases) con el fin de maximizar la potencia del procedimiento de detección.

35 Para detectar DYS14 los presentes inventores utilizaron una PCR anidada con los cebadores siguientes: Y1.5 y Y1.6, produciendo un fragmento externo de 239 pares de bases; Y1.7 y Y1.8, produciendo un fragmento interno de 198 pares de bases (Lo Y-M. D. *et al.*, Lancet 335:1463-1464, 1990).

40 Se llevaron a cabo treinta y cinco o cuarenta ciclos de reacción de PCR. Las condiciones de cada ciclo fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; hibridación a 58°C-63°C (dependiendo de los cebadores, tal como se describe posteriormente) durante 60 segundos; alargamiento de cadena a 72°C durante 30 segundos. La etapa de desnaturalización se prolongó hasta los 2 minutos al inicio del primer ciclo y la última etapa de alargamiento se prolongó hasta los 7 minutos. La hibridación se realizó a 63°C para los cebadores YZ1/YZ2 y a 58°C para los cebadores Y1/Y2. Para la PCR anidada, se realizaron cuarenta ciclos con los cebadores Y1.5/Y1.6, seguido de 25 ciclos con los cebadores Y1.7/Y1.8, en ambos casos a 58°C.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10 % (29:1), tampón de electroforesis 1 x TBE, 10 V/cm, durante 2,5 horas a temperatura ambiente y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

50 Se muestran los resultados en las figuras 4A, 4B y 5. En la figura 4A, se detectó un producto PCR de DYZ1 de 154 pares de bases, una secuencia repetida del cromosoma Y, utilizando los cebadores Y1 e Y2. El carril M es un digerido con mspI de pBR322 que sirve de estándar de peso molecular; el control negativo (carril 1, sin adición de ADN) no mostró bandas detectables; los controles positivos (carriles 2-5, representando 0,1, 1,0, 10 y 100 pg de ADN total masculino, respectivamente) mostraban bandas de intensidad creciente; el primer grupo de muestras de ensayo, de mujeres embarazadas con fetos varones (carriles 6 y 8) mostraban bandas claras del mismo tamaño que aquéllas en los controles positivos; la segunda muestra de ensayo, de una mujer embarazada con un feto hembra (carril 7) no mostraba bandas; dos carriles de control más (9, que representaba una muestra de blanco, y 10, que representaba ADN de orina de una mujer no embarazada) no mostraban evidencia de bandas.

60 En la figura 4B, se detectó un producto PCR de DYZ1 de 97 pares de bases utilizando los cebadores YZ-1 e YZ-2. El carril M es un digerido con mspI de pBR322 que sirve de estándar de peso molecular; los controles positi-

vos (carriles 1-3, representando 0,1, 1,0 y 10 pg de ADN total masculino, respectivamente) mostraban bandas de intensidad creciente; las primeras muestras de ensayo, de mujeres embarazadas con fetos hembra (carriles 4 y 5) no mostraban bandas; el segundo grupo de muestras de ensayo, de mujeres embarazadas con fetos varones (carriles 6 y 7) mostraban bandas del mismo tamaño que aquéllas en los controles positivos; dos carriles de control más (8, representando una muestra de blanco, y 9, representando ADN de orina de una mujer no embarazada) no mostraban evidencia de bandas.

En la figura 5, se detectó una secuencia de ADN de copia única específica del cromosoma Y (198 pares de bases) en la orina de mujeres embarazadas con fetos varones. La pista M es un digerido con msp1 de pBR322 que sirve de estándar de peso molecular; el control negativo (carril 1, sin adición de ADN) no mostraba bandas detectables; los controles positivos (pistas 2-5, representando 0,1, 1,0, 10 y 100 pg de ADN total masculino, respectivamente) mostraban bandas de intensidad creciente; el primer grupo de muestras de ensayo, de mujeres embarazadas con fetos varones (carriles 6 y 7), mostraban bandas claras del mismo tamaño que aquéllas en los controles positivos; la segunda muestra de ensayo, de una mujer embarazada con un feto hembra (pista 8) no mostraba bandas; dos carriles de control más (9, representando una muestra de blanco, y 10 representando ADN en orina de una mujer no embarazada) no mostraban evidencia de bandas.

Los resultados de estos experimentos apoyan las conclusiones siguientes respecto a la presente invención: una fracción de ADN de células moribundas en el cuerpo animal o humano cruzan la barrera renal y pueden detectarse en orina en forma polimérica, a pesar de la presencia de ADNasas; una fracción de ADN de células moribundas en el embrión en desarrollo cruza las barreras placentaria y renal y puede detectarse en la orina de la madre; el tamaño del ADN en orina exterior a células resulta suficiente para amplificarse por PCR; y la concentración del ADN fetal en la orina de la madre, incluso en los primeros pocos meses de embarazo, es suficientemente elevada para detectar genes que existen únicamente en forma de copia única en el genoma fetal.

Además, los resultados dan soporte a que la orina materna puede utilizarse específicamente como indicador del sexo fetal, y en general como indicador de la composición del genoma fetal, cuando difiere del genoma materno, que puede utilizarse para el diagnóstico de una enfermedad existente o potencial. El análisis del ADN fetal en la orina de una madre embarazada puede utilizarse para la detección de secuencias de ADN heredadas del padre, incluyendo aquellas secuencias indicativas o causantes de enfermedad. De esta manera, los resultados apoyan que los procedimientos de la presente invención abarcan la determinación del sexo fetal, así como el diagnóstico de determinadas condiciones fetales, que se caracterizan por la presencia de secuencias específicas de ADN en el genoma fetal.

Detección de secuencias específicas del cromosoma Y en la orina de una mujer que ha recibido una transfusión de sangre masculina

En el caso de una mujer que ha recibido una transfusión de sangre de un donante varón, los glóbulos blancos muertos o moribundos del donante es previsible que sean la fuente de secuencias de ADN específicas del genoma del varón en el ADN libre de células de la sangre y orina del receptor.

Se obtuvo una muestra de orina de una mujer 10 días después de recibir una transfusión de 250 ml de sangre completa de un donante varón. El ADN en la orina se aisló y se sometió a ensayo para la presencia de una secuencia específica de varón de 154 pares de bases del cromosoma Y, utilizando los cebadores Y1 e Y2 mediante la utilización de los procedimientos descritos anteriormente.

Se muestran los resultados en la figura 3. El carril 1 es un digerido con Msp1 de pBR322 que sirve de estándar de peso molecular; el carril 2 es un control positivo (0,1 µg de ADN total de linfocitos de un donante varón) que muestra una banda de 154 pares de bases de ADN; el carril 3 es una muestra de blanco (solución salina que se ha sometido a todos los procedimientos de aislamiento y análisis del ADN); el carril 4 es un control negativo (no contiene ADN añadido); y el carril 5, que muestra una secuencia de 154 pares de bases específica del cromosoma Y, es ADN de la muestra de orina de la mujer tras la transfusión de sangre. En un estudio posterior, de nueve mujeres transfundidas con sangre de donante varón, se detectó una banda específicamente masculina en cinco muestras (datos no mostrados). De esta manera, en una realización de la presente invención, pueden utilizarse diversos procedimientos comentados en la presente memoria, así como cualquier procedimiento conocido de la técnica, con el fin de mejorar la sensibilidad del procedimiento.

Los resultados obtenidos demuestran que, en un ser humano, el ADN polimérico exterior a las células sanguíneas moribundas puede permanecer en forma polimérica en la sangre circulante, cruzar la barrera renal y detectarse en la orina mediante PCR. Los resultados muestran además que la secuencias de ADN exteriores a células con genotipos diferentes del genotipo normal de los pacientes pueden detectarse selectivamente en la orina del paciente. Estos resultados apoyan claramente la aplicación de la presente invención para el diagnóstico de patologías relacionadas con alteraciones genéticas.

EJEMPLO 4**ACTIVIDAD ADNasa EN LA ORINA**

5

Este ejemplo examina la actividad ADNasa presente en la orina mediante la evaluación de la cinética de degradación del ADN del fago λ en una muestra de orina.

10 Se añadió ADN exógeno de fago λ (200 pg) a alícuotas de 2,5 ml de una muestra de orina procedente de una mujer embarazada. Se incubaron las alícuotas a 37°C durante diversos periodos de tiempo (entre 0 y 2 horas), se aisló el ADN y se amplificó por PCR (hibridando a 58°C), tal como se describe en el Ejemplo 3, para detectar la presencia de una secuencia de ADN de fago λ de 200 pares de bases. Se utilizaron los cebadores siguientes para amplificar un fragmento de ADN de fago lambda entre los nucleótidos 20722 y 20921:

15

5' CAACGAGAAAGGGGATAGTGC
5' AAGCGGTGTTTCGCAATCTGG

(SEC ID nº 9)

(SEC ID nº 10)

20 Los resultados aparecen en la figura 6. El carril 1, el control positivo (200 pg de ADN de fago λ añadido a un tubo para PCR) muestra una banda clara de aproximadamente 200 pares de bases; las pistas 2-5, que representan muestras incubadas durante 0, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos, respectivamente, muestran señales secuencialmente decrecientes. La actividad de degradación de la ADNasa presente en la orina resulta evidente a partir de esta figura. En una realización, la presente invención abarca la utilización de diversos procedimientos conocidos por el experto en la materia para prevenir la degradación del ADN por ADNasa o por otros constituyentes de la orina.

25

EJEMPLO 5**30 Concentración y purificación de orina**

Se sometieron a ensayo diversos procedimientos para la concentración y la purificación de muestras de orina para mejorar la sensibilidad y exactitud de la detección de ADN en orina.

35

Concentración con butenol. Se añadió ADN marcado con [³²P] con desplazamiento de mellas, intacto o desnaturalizado, a muestras de 20 ml de orina y se sometió a varias etapas de concentración con butanol. Tras cada etapa de concentración, se midió el volumen de muestra y la radioactividad de alícuotas de 50 μ l. Los resultados demostraron una reducción superior al 90 % en el volumen de la muestra a lo largo de 5 extracciones, con un incremento de la radiación de aproximadamente el 100 % en la alícuota de 50 μ l.

40

Purificación en Sephadex. Se añadieron cantidades medidas de Sephadex G-25 Coarse seco (Pharmacia Biotech., Inc., Piscataway, NJ) (entre 2 y 4 gramos, inclusive) a muestras de 10 ml de orina suplementadas con azul de dextrano (A630 - 0,1) de 200.000 daltons. Tras aproximadamente 30 minutos de hinchado, el volumen de hueco se eliminó de la mezcla mediante filtración bajo presión y se midió. El valor de concentración se midió mediante medición de la absorbancia de azul de dextrano a 630 nm. A medida que se incrementaba la cantidad de Sephadex, cayó el volumen de hueco a menos de 2 ml y el valor de concentración se incrementó aproximadamente en 4,5 veces su valor original.

45

50 Aislamiento de ADN nativo y desnaturalizado mediante adsorción en resina de sílice Glassmilk.

También se sometió a ensayo la adsorción en Glassmilk. Se añadió ADN marcado con [³²P] con desplazamiento de mellas, nativo o desnaturalizado, a 2 ml de muestras de orina y se sometió a aislamiento mediante adsorción sobre vidrio en polvo en presencia de isotiocianato de guanidina 6 M (GITC). El adsorbente se lavó seguidamente con GITC, seguido de un lavado con isopropanol. A continuación, el ADN se recuperó en TE. Con este procedimiento se recuperó entre el 80 % y el 90 % del ADN, tanto nativo como desnaturalizado. Se observó que la utilización de detergentes iónicos, tales como el EDTA, que pueden utilizarse para proteger al ADN frente a la actividad ADNasa, también pueden presentar un efecto adverso sobre el proceso de adsorción de algunos materiales, entre ellos las perlas de vidrio. De esta manera, las muestras no se trataron con EDTA previamente a la adsorción sobre resina de sílice.

55

60

EJEMPLO 6**Detección de ADN en orina mediante hibridación**

5 Este ejemplo evalúa la hibridación como técnica para la detección de ADN para la utilización en procedimientos de la presente invención. Se recolectaron muestras de orina de mujeres embarazadas. Se transfirieron muestras de ADN aisladas a partir de 1 ml de orina a membrana Zeta-Probe (Bio-Rad, CA) en NaOH 0,4 M, EDTA 10 mM utilizando un aparato de microfiltración Bio-Dot SF (Bio-Rad). Los procedimientos de prehibridación y de hibridación se llevaron a cabo mediante incubación en solución de hibridación basada en formamida a 42°C durante 16 horas, tal como se ha descrito anteriormente (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó un fragmento de ADN de 979 pares de bases (DYZ1-p) amplificado por PCR a partir de una secuencia DYZ1 repetida específica de cromosoma Y como sonda de hibridación. Los nuevos cebadores de PCR diseñados para amplificar este fragmento son los siguientes:

15 L1: 5'-CCAATCCCATCCAATCCAATCTAC (SEC ID nº 11)
L2: 5'-GCAACGCAATAAAATGGCATGG (SEC ID nº 12)

20 Se marcaron sondas de ADN con [α -³²P]dCTP mediante cebadores aleatorios a una radioactividad específica superior a 5 x 10⁸ pulsos por minuto (cpm)/ μ g. Las membranas de hibridación se lavaron con 2 x SSC, SDS al 0,1 % dos veces, a temperatura ambiente, seguido de lavados de astringencia elevada con 0,1 x SSC, SDS al 0,1 %, a 65°C. Se expuso película Kodak X-Omat AR, con pantalla intensificadora Fisher Biotech L-Plus, a los filtros a temperatura ambiente durante 2 a 16 horas.

25 Se muestran los resultados en la figura 7. El control negativo (carril 1, hembra no embarazada) no mostraba ninguna señal; el control positivo (carril 2, ADN genómico total de varón, 5 ng) muestra hibridación; las muestras de orina procedentes de mujeres embarazadas con fetos varones (carriles 3, 4) presentaban señales marcadas; y las muestras de orina de mujeres embarazadas con fetos hembras (carriles 5, 6) mostraban una señal significativamente menor, fácil de distinguir de las muestras de ensayo positivas y de control. La banda pálida en los carriles 6 y 7 podría ser el resultado de ADN contaminante procedente de zonas circundantes. En la figura, las bandas claras aparecieron únicamente en el control positivo y en la orina de mujeres embarazadas con fetos varones. De esta manera, la hibridación es una técnica efectiva para la detección de ADN en orina para procedimientos de la presente invención, tales como la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos que han cruzado la barrera renal, y más específicamente, para la determinación del sexo fetal. Aunque la técnica de hibridación indica una diferencia clara entre las muestras que son positivas y las que son negativas para la presencia de la secuencia diana de ADN, los procedimientos de la presente invención también abarcan la aplicación de técnicas para controlar la penetración de ADN contaminante en las muestras previamente a la hibridación o a la amplificación.

EJEMPLO 7**Detección prenatal precoz del sexo**

40 Este ejemplo investiga la viabilidad de detectar ADN fetal en la orina materna a edades gestacionales tempranas. Es conocido que las células fetales aparecen en la sangre materna a edades gestacionales de tan sólo 5-9 semanas (Egging *et al.*, Determination of the origin of single nucleated cells in maternal circulation by means of random PCR and a set of length polymorphism, Hum. Genet. 99:266-270, 1997; Thomas *et al.*, The time of appearance, and quantitation, of fetal DNA in the maternal circulation, Annals NY Ac. Sci. 731:217-225, 1994). Se sugiere que la apoptosis es especialmente activa en etapas tempranas del desarrollo embrionario y, por lo tanto, puede esperarse una entrada incrementada de ADN degradado en la circulación materna en dichas etapas, haciendo posible dicha detección temprana.

55 A este fin, se investigaron mujeres embarazadas que habían acudido a una clínica prenatal para la realización de un aborto voluntario (edades de gestación de 5 a 12 semanas) con su consentimiento informado. Se recogieron muestras frescas de orina obtenidas inmediatamente antes de la operación, así como muestras de tejidos embrionarios extirpados durante la cirugía.

60 Se preparó ADN de orina para la amplificación por PCR mediante dos procedimientos: dilución simple de la orina o adsorción sobre intercambiador aniónico DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). Las muestras de dilución simple de orina se diluyeron 10 veces con agua destilada, se calentaron en un baño en ebullición y se utilizaron para PCR (5 a 10 μ l por tubo, es decir, 0,5 a 1 μ l de orina original). Se llevó a cabo la purificación en DEAE-Sephadex A-25 de la manera siguiente. Se pasó un volumen reducido de orina (1 a 1,5 ml) a través de una columna de DEAE-Sephadex-A (volumen de 10 ml) para eliminar impurezas y sales. Las muestras de eluido obtenidas se sometieron directamente a PCR. La concentración de ADN en orina obtenida median-

te adsorción sobre un intercambiador aniónico DEAE-Sephadex A-25 aparentemente era significativamente más elevada (aproximadamente 500 a 700 ng/ml) que la estimada anteriormente (2 a 20 ng/ml). Se determinó la concentración de ADN mediante espectrofluorometría con Hoechst 33258.

5 Se llevó a cabo una PCR tal como se ha indicado en el Ejemplo 3 anteriormente, utilizando los cebadores siguientes. Se determinó el sexo fetal mediante análisis por PCR del ADN de tejido fetal utilizando los cebadores Y1 (SEC ID nº 1) e Y2 (SEC ID nº 2) para amplificar una secuencia DYZ1 específica del cromosoma Y de 154 pares de bases. Debido a que la cantidad de ADN fetal era suficiente, no resultó necesario llevar a cabo una PCR anidada. Se llevó a cabo la PCR anidada con muestras de ADN de orina materna utilizando adicionalmente
10 cebadores nY1 y nY2 para reconocer una secuencia de 77 pares de bases observada dentro de la secuencia de 154 pares de bases:

nY1: 5'-GTCCATTACACTACATTCCC-3' (SEC ID nº 13)
nY2: 5'-AATGCAAGCGAAAGGAAAGG-3' (SEC ID nº 14)

15 Se muestran los resultados en la fig. 8. En 2 de 5 fetos varones, se detectaron secuencias específicas del cromosoma Y en ADN de orina materna a edades gestacionales de 7 a 8 semanas.

20 EJEMPLO 8

Ensayo prenatal de enfermedades congénitas

El resultado principal de que la barrera renal es permeable a moléculas de ADN de tamaño sustancial abre el camino a la utilización de la orina materna para llevar a cabo el diagnóstico prenatal completamente no invasivo de enfermedades congénitas. Esta exploración no invasiva puede llevarse a cabo de la manera siguiente.

En primer lugar, se recoge una muestra de orina de una mujer embarazada. Si se desea, seguidamente puede aislarse el ADN polimérico presente en la muestra de orina, purificarse y/o tratarse para evitar su degradación utilizando procedimientos conocidos de la técnica, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los procedimientos indicados en la presente memoria. A continuación, el ADN polimérico que ha cruzado la barrera renal se amplifica utilizando cebadores específicos de anomalías genéticas asociadas a enfermedades conocidas, o de otra manera se trata para producir una señal detectable si la anomalía específica se encuentra presente. Finalmente, el producto de la amplificación del ADN, o la señal producida, se analiza para determinar si se encuentra presente en el ADN de la orina una anomalía asociada a una enfermedad. En el caso de que se detecte una de estas anomalías y la madre no sea portadora de la anomalía en su genoma, puede deducirse que el feto es portador de la anomalía.

40 EJEMPLO 9

Transferencia en filtro de ADN

Tal como se ha mostrado en los ejemplos anteriores, la PCR anidada permite la detección de cantidades reducidas de ADN en orina. De esta manera, resultaba deseable determinar si el ADN podía analizarse directamente a partir de la orina, y no tener que llevar a cabo una etapa de aislamiento de ADN previamente a la amplificación o a otros procedimientos de detección.

Se recogieron muestras de orina femenina (de aproximadamente 20 ml cada una) y se trataron con varias concentraciones de ADN masculino. Se trataron previamente filtros Hybond N de 3,5 cm (Amersham) con HCl 0,25 N durante 1,5 horas para eliminar cualquier ADN contaminante, seguido del enjuague con agua destilada. Se sumergieron dos filtros en cada muestra de orina y se dejaron incubar durante la noche a temperatura ambiente bajo agitación suave. A continuación, los filtros se retiraron y se enjuagaron con agua destilada. El ADN se desorbió mediante incubación de los filtros con 450 µl de 0,25 x tampón de PCR en un baño en ebullición durante 10 minutos. Se extrajo una alícuota (5 a 10 µl, es decir 0,5 a 1,0 µl de muestra original de orina) de cada muestra para la PCR anidada.

Se muestran los resultados en las figuras 9 y 10. En la figura 9, los carriles 1-4 representan 20 fg, 1 pg, 2 pg y 10 pg de ADN masculino, respectivamente, por cada 1 µl de orina femenina. El control contenía alícuotas de 10 µl de orina diluida 10 veces, introducida directamente en tubos para PCR. Otras muestras de orina se salificaron a concentración salina elevada (10 x SSC) o de álcali (ajustado a pH 12 con NaOH) y se manipularon siguiendo el procedimiento de "transferencia en filtro" descrito en la presente memoria. nc - control negativo; m - estándar de peso molecular. Resulta evidente a partir de la figura que el procedimiento de transferencia simple en filtro proporciona una señal más fuerte que puede detectarse a partir de una transferencia de una cantidad equivalente de orina.

Además, tal como muestra la figura 10, la adsorción de ADN de orina sobre filtros Hybond N aparentemente ha protegido al ADN frente a la digestión por nucleasas. Esta protección se complementó mediante el incremento del pH de la muestra. La sección A representa los controles (carriles: 1 - se introdujeron directamente en tubos para PCR alícuotas de 10 µl de orina diluida 10 veces inmediatamente después de la adición de ADN masculino; 2 - se introdujeron alícuotas de 10 µl de orina diluida 10 veces en tubos para PCR tras la incubación durante la noche a temperatura ambiente; 3 - se incubaron los filtros Hybond N en orina durante la noche y se utilizaron para la transferencia de ADN (para el análisis se utilizaron alícuotas de 10 µl del eluido). Sección B - todos los procedimientos tal como en A, excepto en que las muestras de orina se concentraron a 10 mM en EDTA y se ajustaron a pH 12.

EJEMPLO 10

Diagnóstico de tumores

La capacidad de aislar cantidades significativas de ADN a partir de muestras de orina, tal como se muestra en el Ejemplo 3, también añade la capacidad de evaluar a un paciente, de un modo no invasivo, para la presencia de una o más de entre numerosas anomalías del ADN que indican la existencia o la propensión a una enfermedad de interés. Dicho método presenta aplicaciones en el diagnóstico precoz y el tratamiento de muchos cánceres e infecciones por patógenos que no se caracterizan por la excreción de células directamente en el tracto urinario, tales como, aunque sin limitarse a ellas, cánceres o infecciones que existen en áreas aisladas del cuerpo y que no resultan fácilmente detectables por otros medios. Puede llevarse a cabo dicho cribado no invasivo de la manera siguiente.

En primer lugar, se recoge una muestra de orina de un paciente. En caso que se desee, seguidamente el ADN polimérico en la muestra de orina puede aislarse, purificarse y/o tratarse para impedir la degradación utilizando métodos conocidos de la técnica, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los métodos descritos en la presente memoria. El ADN polimérico que ha cruzado la barrera renal seguidamente se amplifica utilizando cebadores específicos para anomalías genéticas asociadas a enfermedades conocidas, o de otro modo, se trata para producir una señal detectable en el caso de que la anomalía específica se encuentre presente.

Algunos métodos de amplificación resultan en una especificidad mejorada al aplicarse para detectar cambios pequeños del ADN, tales como mutaciones puntuales. Por ejemplo, puede utilizarse el método altamente sensible de PCR doble RFLP (PCR-dRFLP) (Grau y Griffais, NAR 22:5773-5774, 1994) para diagnosticar una mutación que crea o destruye un sitio de restricción natural o artificial. Sin embargo, la PCR-RFLP en ocasiones presenta una dificultad técnica debido a que una actividad defectuosa de un enzima de restricción puede confundirse con la pérdida del sitio de restricción. Además, la presencia de un sitio de restricción puede resultar experimentalmente más sencilla de determinar que su ausencia. Para superar esta dificultad, pueden llevarse a cabo adicionalmente dos amplificaciones de PCR anidada modificadas para cada ADN estudiado, diseñando una pareja de cebadores de PCR para introducir un sitio de restricción específico para el alelo de tipo salvaje, mientras que se diseña la segunda pareja de cebadores para introducir un sitio de restricción específico para el alelo mutante. Cada producto de PCR seguidamente se analiza mediante RFLP. Estas dos RFLPs permiten una interpretación menos ambigua de los resultados. Esencialmente, de alguna manera cada mutación elimina un sitio de restricción en la secuencia de tipo salvaje para crear una nueva en la mutante.

Finalmente, el producto de la amplificación de ADN, o la señal producida, se analiza para determinar o no la presencia en el ADN de orina de una anomalía asociada a enfermedad, permitiendo de esta manera un diagnóstico no invasivo de muchas enfermedades caracterizadas por la modificación del ADN de un paciente.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE:

Lichtenstein, Anatoly V.
Umansky, Samuil R.
Melkonyan, Hovsep S.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO EN ORINA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 14

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: LXR BIOTECHNOLOGY INC.
(B) CALLE: 1401 Marina Way South
(C) CIUDAD: Richmond
(D) ESTADO: CA
(E) PAÍS: USA
(F) ZIP: 94804

5

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

10

(A) TIPO DE MEDIO: disquete
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn emisión nº 1.0, versión nº 1.30

15

(vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:

20

(viii) DATOS DEL CESIONARIO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Wilke, Kathryn P.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 37.472
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 23647-20022.40

25

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

(B) TELEFAX: (510) 412-9109

30

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 1:

TCCACTTTAT TCCAGGCCTG TCC
23

40

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 2:

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 2:

TTGAATGGAA TGGGAACGAA TGG
23

55

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 3:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 3:

CCATTCCTTT GCATTCCGTT TCC
23

10 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 4:

20 ATCGACTGGC AGGGAACCAA AAG
23

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 5:

CTAGACCGCA GAGGCGCCAT
20

35

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 6:

TAGTACCCAC GCCTGCTCCG G
21

50

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de basesa
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 7:

CATCCAGAGC GTCCCTGGCT T
21

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 8:

CTTTCCACAG CCACATTTGT C
21

15 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 20 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 9:

CAACGAGAAA GGGGATAGTG C
21

30 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 35 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SEC ID nº 10:

40 AAGCGGTGTT CGCAATCTGG
20

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 11:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 50 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 11:

55 CCAATCCCAT CCAATCCAAT CTAC
24

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 12:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 12:

5 GCAACGCAAT AAAATGGCAT GG
 22

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 10 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 13:

 GTCCATTACA CTACATTCCC 20

20 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID nº 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 25 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: única
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 14:

 AATGCAAGCG AAAGGAAAGG
 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar una secuencia de ácidos nucleicos que no es del huésped, comprendiendo dicho método la realización de un ensayo en una muestra de orina obtenida de un individuo, para una secuencia de ácidos nucleicos, que:
- 10 (i) procede del exterior del tracto urinario,
(ii) ha cruzado la barrera renal, y
(iii) no es originaria de las secuencias de ácidos nucleicos endógenas del paciente,
- en el que los ácidos nucleicos contaminantes en la muestra de orina que comprenden más de 1.000 pares de bases, ó 1.000 nucleótidos en el caso de que se hayan desnaturalizado, se extraen de la muestra previamente a la detección de dicho ácido nucleico que no es del huésped.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método diagnostica la infección por un ácido nucleico que no es del huésped, que contiene patógenos que infectan áreas diferentes del tracto urinario y que no liberan ácidos nucleicos directamente al interior del tracto urinario.
- 20 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra de orina se ha mantenido en la vejiga durante menos de 12 horas.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ensayo para la presencia de dicha secuencia de ácidos nucleicos comprende aislar sustancialmente dicho ácido nucleico en dicha muestra de orina.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho ácido nucleico en dicha muestra de orina
- 30 a) se aísla sustancialmente mediante precipitación.
b) se aísla sustancialmente mediante tratamiento con un material adsorbente sólido, o
c) se aísla sustancialmente mediante adsorción sobre una resina.
- 35 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende la etapa de someter a ensayo la presencia de una secuencia diana de ácidos nucleicos mediante hibridación, reacción de sonda cíclica, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de conformación de cadena sencilla, reacción en cadena de la ligasa, amplificación por desplazamiento de cadena o polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.
- 40 7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha reacción en cadena de la polimerasa utiliza cebadores suficientemente complementarios para hibridarse con dicha secuencia diana.
8. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además amplificar dicha secuencia diana de ácidos nucleicos.
- 45 9. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho ácido nucleico es ADN.
10. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho ácido nucleico es ARN.
- 50 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además reducir la degradación de los ácidos nucleicos en dicha muestra de orina.
- 55 12. Método según la reivindicación 11, en el que la degradación de los ácidos nucleicos se reduce mediante inhibición de la actividad de nucleasa mediante incremento del pH, incremento de la concentración salina, inactivación por calor o mediante tratamiento de dicho ácido nucleico con un compuesto seleccionado de entre ácido etilendiamintetraacético, HCl de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina y dodecilsulfato sódico.
- 60 13. Método según la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos contaminantes en la muestra de orina que comprenden más de 300 pares de bases, ó 300 nucleótidos en el caso de que se haya desnaturalizado, resultan eliminados de la muestra previamente a la detección mediante filtración, y la etapa de someter a ensayo para ácidos nucleicos en dicha muestra de orina se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que no es del huésped se encuentra asociada a un patógeno.

15. Método según la reivindicación 14, en el que dicho patógeno es un virus, bacteria, hongo, micoplasma o protozoo.

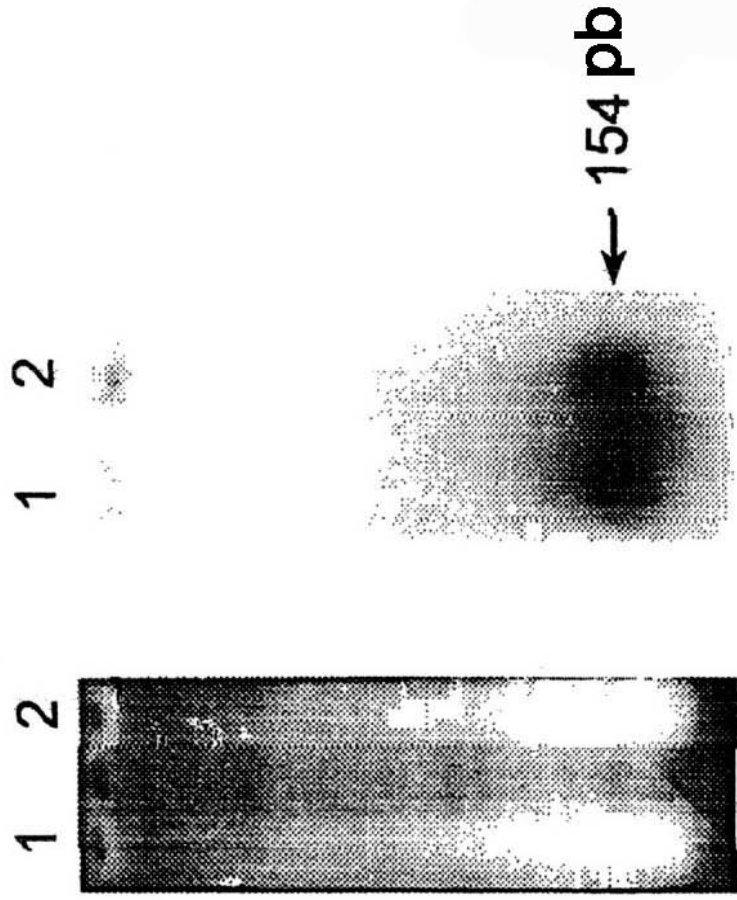


Figura 1A **Figura 1B**

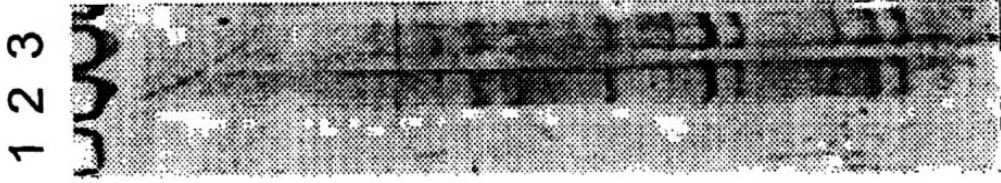


Figura 2

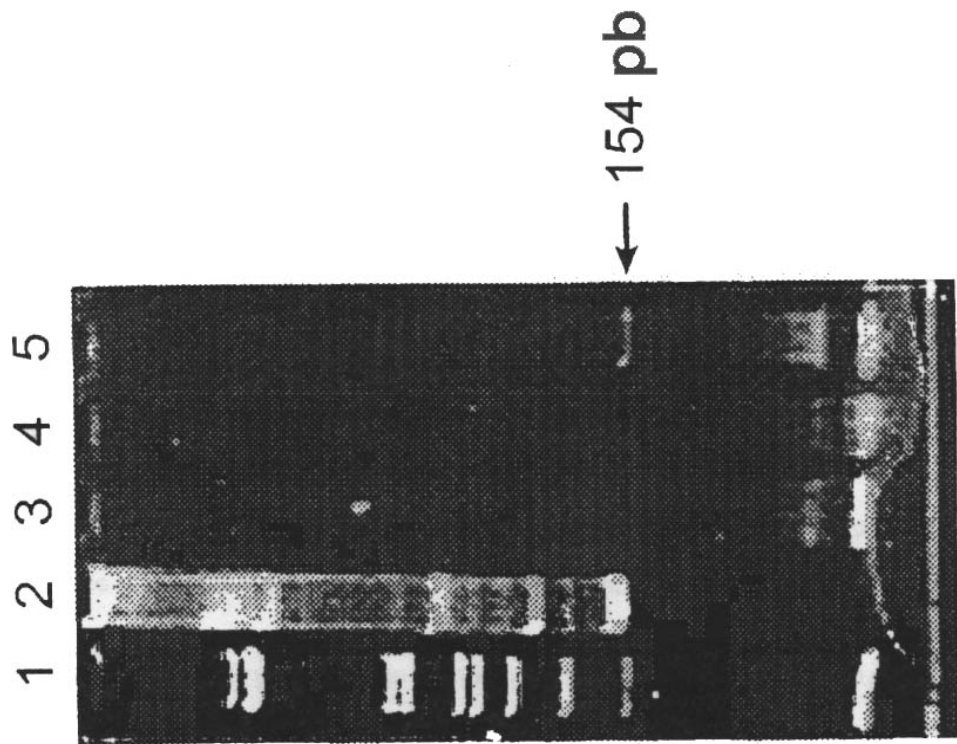


Figura 3

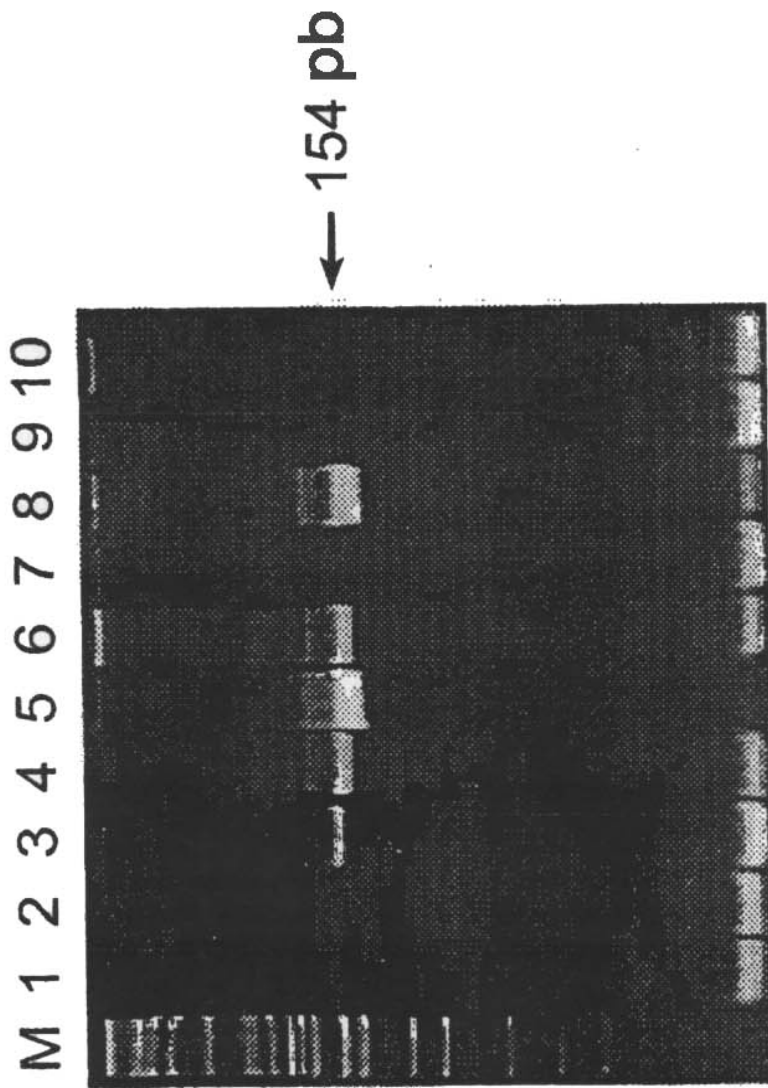


Figura 4A

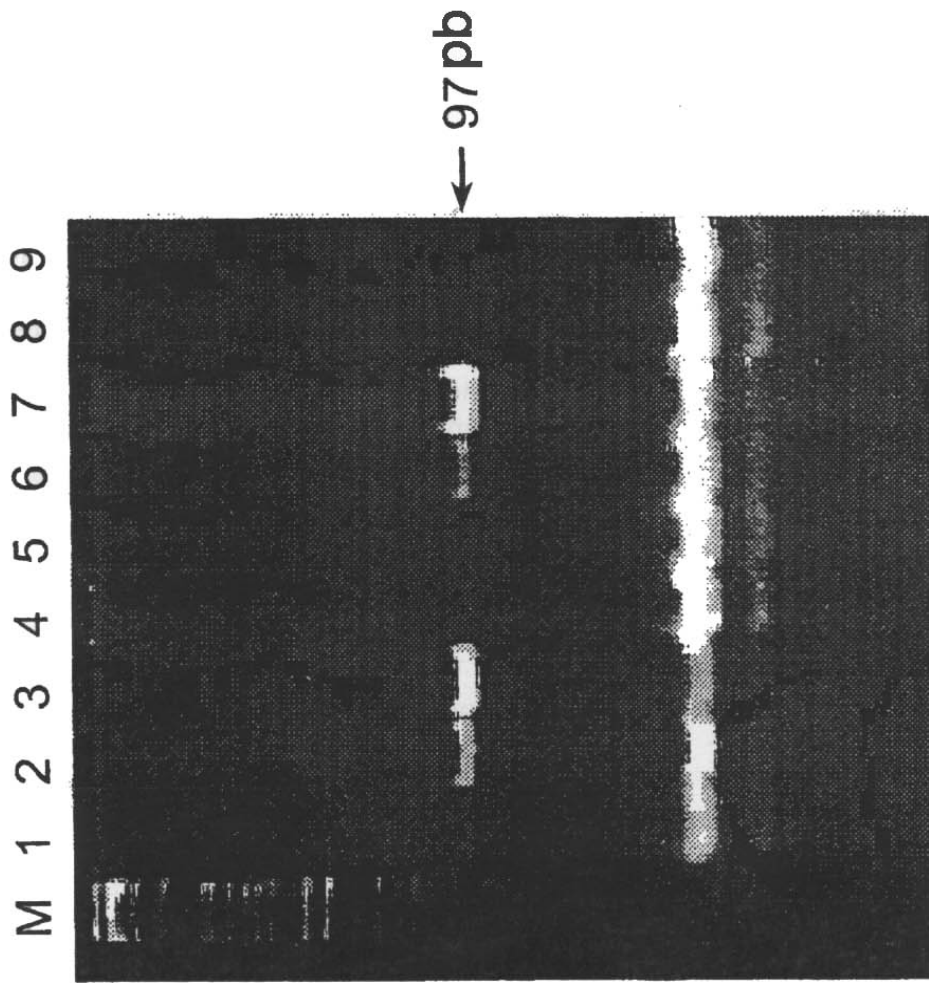


Figura 4B

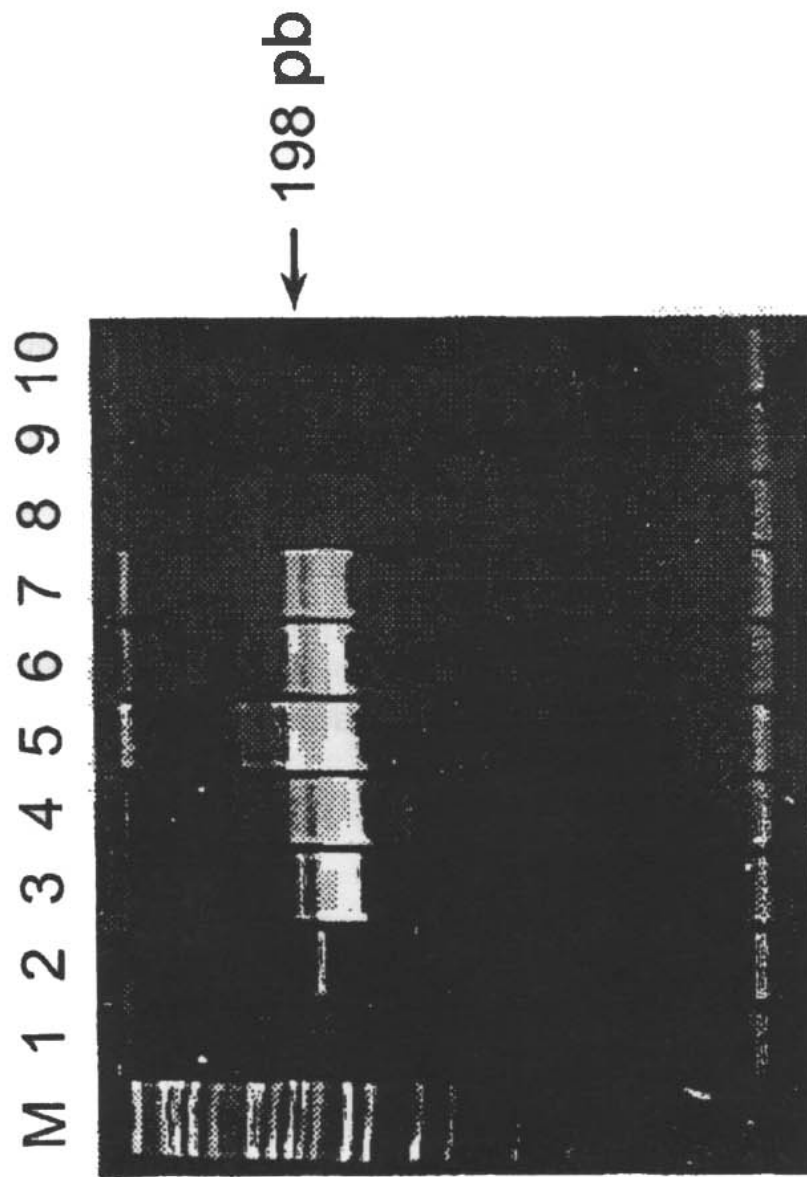


Figura 5

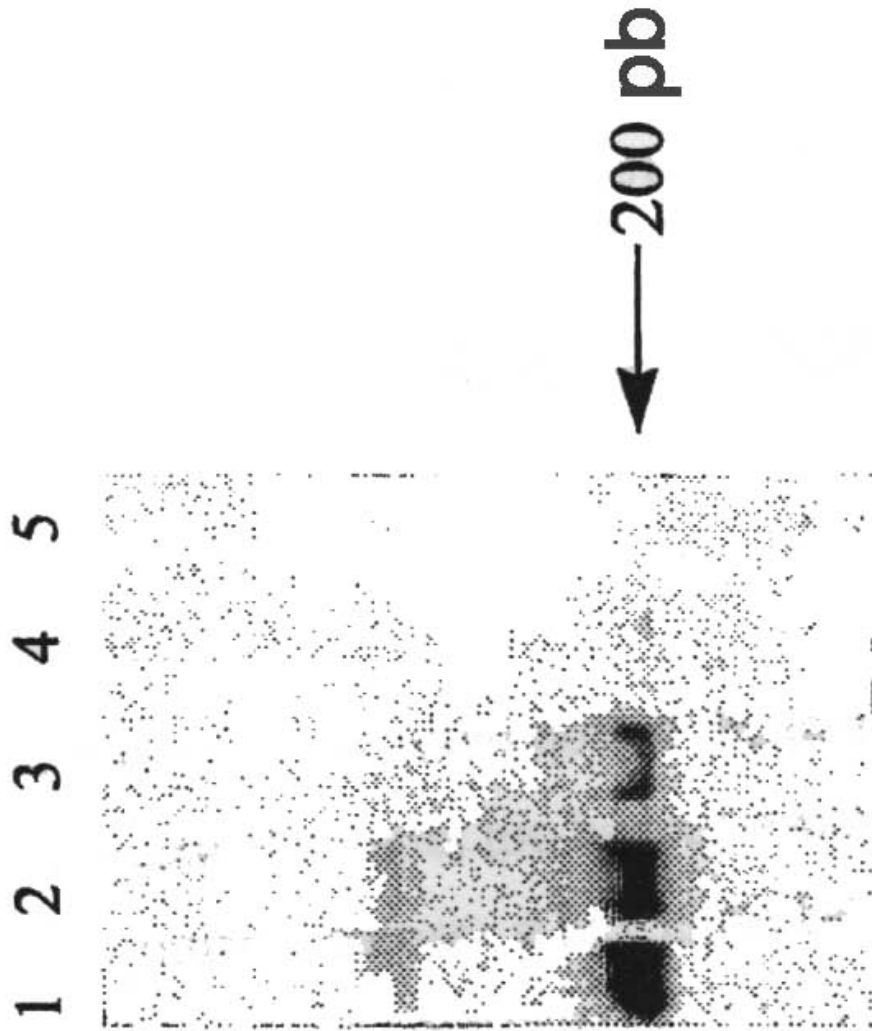


Figura 6

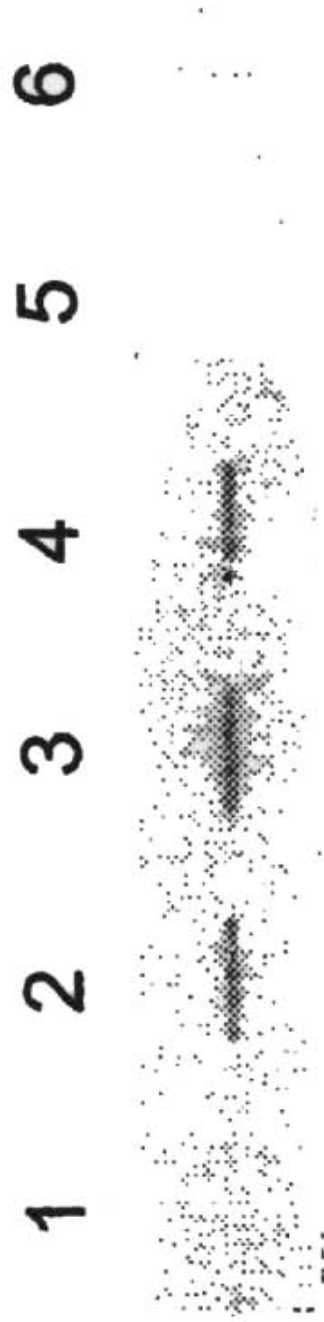
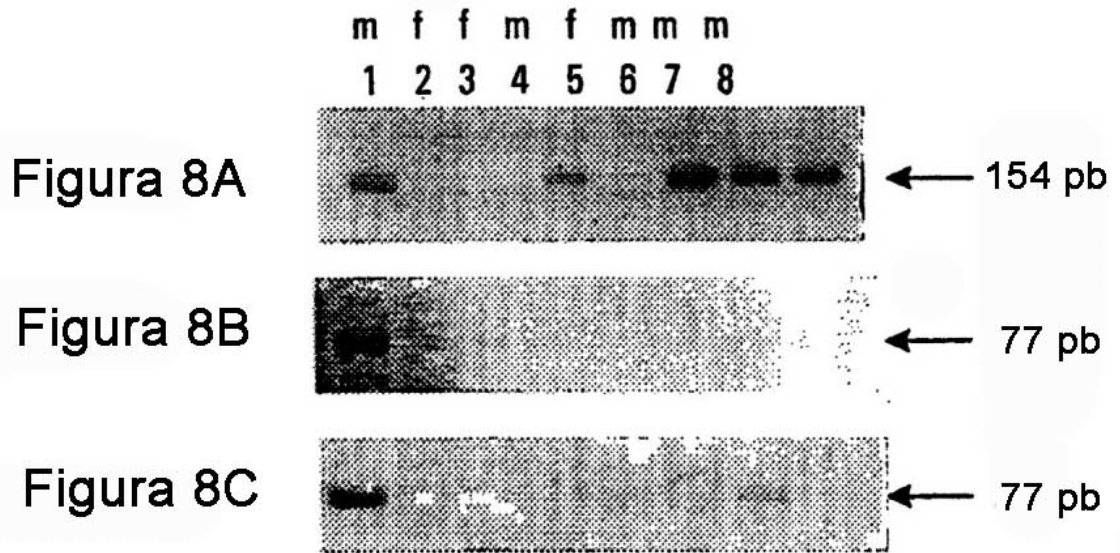


Figura 7



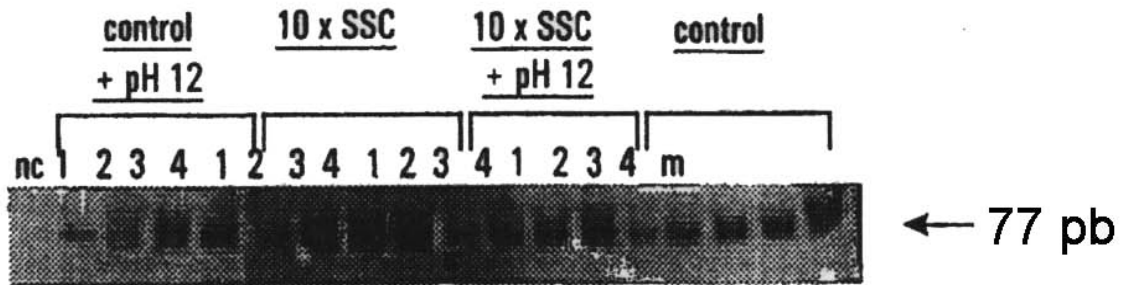


Figura 9



Figura 10A



Figura 10B

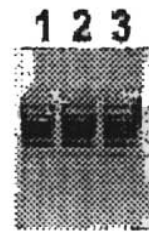


Figura 10C

← 77 pb