

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 233**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2006 E 06722064 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1859050**

54 Título: **Un método para la detección de aneuploidías cromosómicas**

30 Prioridad:

**18.03.2005 US 663173 P**

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

**14.03.2013**

73 Titular/es:

**THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG  
(50.0%)**

**Shatin, N.T.**

**Hong Kong, CN y**

**TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LO, YUK-MING DENNIS;**

**CHIU, ROSSA WAI KWUN;**

**TSUI, BO YIN;**

**DING, CHUNMING y**

**CANTOR, CHARLES**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 398 233 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

Un método para la detección de aneuploidías cromosómicas

## 5 Antecedentes de la invención

[0001] La aneuploidía cromosómica es una causa importante de morbilidad durante la vida prenatal y postnatal. La evaluación de la aneuploidía cromosómica se ha asociado tradicionalmente con la investigación de la viabilidad fetal y diagnóstico prenatal. Los métodos para la detección y caracterización de aneuploidía cromosómica incluyen establecimiento de cariotipo de cromosomas en metafase, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) (Homer, J. *et al.*, Prenat Diagn 23:566-571 (2003)), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con fluorescencia cuantitativa (Mann, K. Methods Mol Med 92:141-156 (2004)), PCR de dosificación génica (Zimmermann, B. *et al.*, Clin Chem 48:362-363 (2002)), hibridación genómica comparativa basada en matrices (CGH) (Hu, D.G. *et al.*, Mol Hum Reprod (2004)).

[0002] Se sabe que la aneuploidía cromosómica fetal contribuye significativamente a pérdida fetal y representa 50% de los abortos espontáneos del primer trimestre (Chitty, 54:839 L. Br Med Bull-856 (1998)). Los fetos viables están asociados especialmente con ciertos tipos de aneuploidía cromosómica. La trisomía del 21, o síndrome de Down, es la aneuploidía autosómica más común compatible con supervivencia postnatal con una incidencia de 1 de cada 800 nacimientos vivos (Hook, E. B. Lancet 2:169-172 (1981)). La trisomía del 21 es la razón más habitual por la que las parejas optan por el diagnóstico prenatal. En la actualidad, el diagnóstico definitivo de un feto con trisomía del 21 y otras aneuploidías cromosómicas se basa en el análisis genético de material genético fetal obtenido por procedimientos invasivos tales como amniocentesis y toma de muestras de la vellosidad del corion (CVS). Debido a su naturaleza invasiva, estos procedimientos están asociados con un riesgo limitado de aborto espontáneo. Por lo tanto, se han desarrollado otros enfoques no invasivos para estratificar los embarazos de acuerdo con el riesgo de portar un feto con trisomía del 21. Solo se recomienda que se sometan a los procedimientos invasivos embarazos con un riesgo sustancial, definido como un riesgo mayor que el riesgo de pérdida fetal relacionado con el procedimiento. Las estrategias de estratificación del riesgo que se usan en la actualidad incluyen la evaluación de la edad materna, marcadores bioquímicos en suero materno y elementos de ultrasonido fetal (Nicolaidis, K. H. *et al.*, Prenat Diagn 22:308-315 (2002)).

[0003] Para conseguir una mejor sensibilidad y especificidad, se han evaluado diversas combinaciones de marcadores y enfoques (Wald, N. J. *et al.*, Prenat Diagn 17:821-829 (1997)), incluyendo el ensayo triple, ensayo cuádruple (Wald, N. J. *et al.*, Lancet 361:835-836 (2003)), ensayo integrado (Wald, N. J. *et al.*, N Engl J Med 341:461-467 (1999)) y exploración de primer trimestre (Wapner, R. *et al.*, N Engl J Med 349:1405-1413 (2003)). Los marcadores bioquímicos de suero en uso incluyen alfa-fetoproteína, estriol no conjugado, gonadotropina coriónica humana beta libre o total, inhibina-A y proteína A de plasma asociada con el embarazo (PAPP-A). Los embarazos cuyo riesgo se ha mostrado que es alto por estas modalidades de exploración se remiten en última instancia a amniocentesis o CVS.

[0004] Recientemente, el descubrimiento de ácidos nucleicos fetales sin células en circulación en el plasma materno ha proporcionado una fuente alternativa de material genético fetal del que pueden tomarse muestras de forma no invasiva (Lo, Y. M. D. *et al.*, Lancet 350:485-487 (1997); Poon, L. L. M. *et al.*, Clin Chem 46:1832-834 (2000)). Además, se ha mostrado que las concentraciones de ADN fetal en circulación en el plasma de mujeres que portan fetos con trisomía del 21 son significativamente mayores que las de mujeres que portan fetos euploides (Lo, Y. M. D. *et al.*, Clin Chem 45:1747-1751 (1999); Zhong, X. Y. *et al.*, Prenat Diagn 20:795-798 (2000)). Recientemente, también se ha mostrado que el ARN fetal en circulación es prometedor como una clase de marcador de ácido nucleico fetal independiente del sexo en el plasma materno. (Ng, E. K. O. *et al.*, Clin Chem 49:727-731 (2003); Ng, E. K. O. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 100:4748-4753 (2003)). Por lo tanto, la cuantificación de ácido nucleico fetal en circulación es útil como un marcador de exploración prenatal adicional para la estratificación de los embarazos por riesgo.

[0005] Se ha mostrado que los transcritos de ARNm expresados en placenta, tales como los que codifican el *lactógeno placentario humano (hPL)*, *subunidad beta de gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ hCG)* (Ng, E. K. O. *et al.*, Clin Chem 49:727-731 (2003)), *hormona liberadora de corticotropina (CRH)* (Ng, E. K. O. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 100:4748-4753 (2003b)), *inhibidor de la ruta de factor tisular 2 (TFPI2)*, *supresor de metástasis KiSS-1 (KISS1)* y *específico de placenta 1 (PLAC1)* (Tsui, N. B. Y. *et al.*, J Med Genet 41:461-7 (2004)), son detectables en plasma materno. Se sabe que estas especies de ARNm derivado de placenta son específicos del embarazo (Ng, E. K. O. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 100:4748-4753. 2003); Tsui, N. B. Y. *et al.*, J Med Genet 41:461-7 (2004)). En particular, se han presentado aumentos aberrantes de concentraciones de ARNm de *CRH* en plasma materno en embarazos con preeclampsia (Ng, E. K. O. *et al.*, Clin Chem 49:727-731 (2003)). Ya que estos marcadores expresados en placenta son específicos de embarazo pero independientes de sexo y polimorfismo, son útiles en la evaluación prenatal no invasiva de todos los embarazos.

[0006] La aneuploidía cromosómica altera la dosificación de genes localizados en el cromosoma aneuploide. La

dosificación génica alterada puede reflejarse en una relación de alelos distorsionada de los genes. La relación de alelos distorsionada se ve a su vez reflejada por una relación de alelos distorsionada de polimorfismos presentes en el transcrito de ARN de los loci genéticos en el cromosoma aneuploide. Un ejemplo de tales polimorfismos es el polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el que la relación de los alelos de SNP puede distorsionarse en presencia de aneuploidía del cromosoma en cuestión. Por lo tanto, se establece un intervalo de referencia para la relación de ARN-SNP para embarazos normales y puede determinarse la trisomía del 21 fetal cuando se observa una desviación de la relación de referencia. En comparación con métodos citogenéticos convencionales de análisis, la técnica propuesta no requiere cultivo previo de las células fetales y por lo tanto acorta el tiempo analítico. Además, pueden obtenerse muestras de sangre materna de forma no invasiva, minimizando de este modo el daño potencial tanto al feto como a la madre.

### Descripción resumida de la invención

**[0007]** En una realización, la presente invención proporciona un método mejorado para detectar la presencia de un trastorno cromosómico en el feto de una mujer embarazada usando la relación de alelos de moléculas de transcritos de ARN del feto de la mujer embarazada en comparación con la relación hallada en mujeres embarazadas con un feto cromosómicamente normal. El uso de la relación de esta manera proporciona sensibilidad superior en la detección de trastornos cromosómicos fetales, especialmente cuando se comparan con la mera cuantificación de la cantidad de un alelo particular o la concentración total de un transcrito de ARN particular presente.

**[0008]** La primera etapa del método implica determinar la relación de alelos de los transcritos de ARN en el feto de una mujer embarazada. Esto se consigue obteniendo una muestra biológica que contiene ARN de la mujer embarazada, en la que la muestra biológica que contiene ARN contiene ARN fetal. Los alelos se diferencian después del ARN transcrito de al menos un locus genético de al menos un cromosoma de interés, seguido de la determinación de la relación de los alelos de los transcritos de ARN. La segunda etapa implica comparar la relación de la mujer embarazada con un control convencional que representa una relación media de alelos de muestras biológicas comparables obtenidas de mujeres embarazadas que portan cada una un feto cromosómicamente normal, en las que un aumento o reducción en la relación del control convencional indica un mayor riesgo de tener un feto con un trastorno cromosómico.

**[0009]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método en el que el trastorno cromosómico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en trisomía de 21, trisomía del 18 y trisomía del 13. En otras realizaciones, el trastorno cromosómico es trisomía del 21. En otra realización, el trastorno cromosómico es trisomía del 13. En una realización adicional, el trastorno cromosómico es trisomía del 18. En otra realización más, el trastorno cromosómico implica el cromosoma X o el cromosoma Y.

**[0010]** En otra realización, la presente invención proporciona un método en el que la muestra biológica de la etapa de obtención de una muestra biológica que contiene ARN es un miembro seleccionado del grupo que consiste en sangre materna, plasma o suero materno, líquido amniótico, una muestra de vellosidad del corion, material de biopsia de un embrión preimplantación, células nucleadas fetales o residuos celulares fetales aislados de la sangre materna, orina materna, saliva materna, lavados del tracto reproductivo femenino y una muestra obtenida por celocentesis. En otra realización más, la muestra biológica es sangre materna. En otra realización más, la muestra biológica es una muestra de vellosidad del corion. En una realización adicional, la muestra biológica contiene elementos celulares o residuos celulares en sangre materna.

**[0011]** En otras realizaciones, la presente invención proporciona un método en el que el ARN fetal de la etapa de obtención de una muestra biológica que contiene ARN deriva de la placenta.

**[0012]** En otra realización, la presente invención proporciona un método en el que la etapa de diferenciación de los alelos de ARN implica reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

**[0013]** En una realización adicional, la presente invención proporciona un método en el que la etapa de diferenciación de los alelos de ARN y/o la etapa de determinar la relación de los diferentes alelos se realiza usando un miembro seleccionado del grupo que consiste en una reacción de extensión de cebador, espectrometría de masas, hibridación usando al menos una sonda, hibridación usando al menos una sonda marcada con fluorescencia, secuenciación directa, clonación y secuenciación, y electroforesis.

**[0014]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método en el que los alelos de las etapas que implican diferenciar los alelos de ARN, determinar la relación de los diferentes alelos y comparar la relación de la etapa previa con un control convencional se diferencian por variación de secuencia. En otra realización, la variación de secuencia es un polimorfismo de un único nucleótido (SNP). En una realización adicional, la variación de secuencia es un polimorfismo de inserción/deleción. En otra realización más, la variación de secuencia es un polimorfismo de repetición en tándem sencilla.

**[0015]** En otras realizaciones, la presente invención proporciona un método en el que el ARN se transcribe de un

miembro seleccionado del grupo que consiste en cromosoma 21, cromosoma 18, cromosoma 13, cromosoma X y cromosoma Y. En otra realización, el ARN se transcribe del cromosoma 21. En una realización adicional, el ARN se transcribe del cromosoma 18. En otra realización más, el ARN se transcribe del cromosoma 13.

- 5 **[0016]** En otra realización, la presente invención proporciona un método en el que el ARN se expresa en la placenta a un nivel que es dos veces o más el de la sangre materna. En algunas realizaciones, el ARN se expresa en la placenta a un nivel que es cinco veces o más el de la sangre materna. En otras realizaciones, el ARN se expresa en la placenta a un nivel que es diez veces o más el de la sangre materna.
- 10 **[0017]** En una realización adicional, la presente invención proporciona un método en el que el ARN es ARNm. En otra realización, el ARN se transcribe de al menos un locus genético seleccionado del grupo que consiste en *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)*, *superóxido dismutasa 1 (SOD1)*, *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)*, *subunidad O de ATP sintasa mitocondrial (ATP5O)*, *familia BTG*, *miembro 3 (BTG 3)*, *motivo de tipo desintegrina a y metaloproteasa (tipo reproductiva) con trombospondina tipo 1, 1 (ADAMTS1)*, *enzima de escisión de APP en sitio beta 2 (BACE2)*,
- 15 *intersectina 1 (ITSNI)*, *proteína precursora de beta amiloide (A4) (APP)*, *ATP sintasa, complejo F0 mitocondrial transportador de H<sup>+</sup>*, *subunidad F6 (ATP5J)*, *gen 5 de región crítica del síndrome de Down (DSCR5)*, *específico de placenta 4 (PLAC4)*, *proteína hipotética BC005107 (LOC90625)*, *proteína ribosómica L17 (RPL17)*, *inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) miembro 2 (SERPINB2)* y *colágeno tipo IV alfa 2 (COL4A2)*. En otra realización más, el ARN se transcribe de un locus genético que contiene un polimorfismo de un único nucleótido. En
- 20 otras realizaciones, el ARN se transcribe de al menos un locus genético seleccionado del grupo que consiste en *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)* y *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)*. En otras realizaciones más, el SNP del ARN transcrito del locus genético *COL6A1* es <sup>Arg</sup>850<sub>His</sub> o <sup>Ser</sup>932<sub>Ser</sub>. En otra realización más, el SNP del ARN transcrito del locus genético *COL6A2* es <sup>Val</sup>728<sub>Val</sub>.
- 25 **[0018]** En otra realización, la presente invención proporciona un método en el que el ARN se transcribe del locus genético para *específico de placenta 4 (PLAC4)*. En otra realización más, el ARN se transcribe de cualquier variante del gen *PLAC4* tal como AF269287, AK027868, AK092431, BC093685, BC101615, BC101617, L13197, NM\_182832 y LOC191585. En otra realización más, el ARN transcrito del locus genético del gen *PLAC4* contiene un polimorfismo de un único nucleótido, o un polimorfismo de inserción-delección seleccionado del grupo que consiste en rs3804026,
- 30 rs4818219, rs9977003, rs7844, rs9015, rs13643, rs9305729, rs9305730, rs5019195, rs5019194, rs5844069, rs1049904, rs16998089, rs12482116, rs11909439, rs7278659, rs12106409, rs12106395, rs12106401, rs12106434, rs2183584, rs3949725, rs8130833, rs10222145 y rs9981478 u otros polimorfismos localizados dentro del locus del gen *PLAC4* tales como *PLAC4-41471145* y *PLAC4-41476236*.
- 35 **[0019]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método en el que la mujer está durante el primer trimestre de gestación. En otras realizaciones, la mujer está durante el segundo o tercer trimestre de gestación.
- [0020]** En una realización adicional, la presente invención proporciona un método en el que la etapa de comparación muestra un aumento del riesgo de que el feto tenga un trastorno cromosómico si la relación de los alelos de los transcritos de ARN en el feto de una mujer embarazada es mayor o menor en 1 desviación típica que el control convencional. En otra realización, la etapa de comparación muestra un aumento del riesgo de que el feto tenga un trastorno cromosómico si la relación de los alelos de los transcritos de ARN en el feto de una mujer embarazada es mayor o menor en 2 desviaciones típicas que el control convencional. En algunas otras
- 45 realizaciones, la etapa de comparación muestra un aumento del riesgo de que el feto tenga un trastorno cromosómico si la relación de los alelos de los transcritos de ARN en el feto de una mujer embarazada es mayor o menor en 3 desviaciones típicas que el control convencional.
- [0021]** En otra realización, la presente invención proporciona un kit para detectar la presencia de un feto con un trastorno cromosómico en una mujer embarazada. Un componente del kit son cebadores para amplificar la región de interés. Otro componente del kit es un control convencional que representa una relación media de los alelos de muestras biológicas comparables obtenido de mujeres embarazadas que portan cada una un feto cromosómicamente normal. En otra realización más, un tercer componente del kit comprende sondas de hibridación para diferenciar entre los diferentes alelos de cada especie de ARN.

55

#### Breve descripción de los dibujos

- [0022]** **Figura 1.** Ilustración esquemática de una realización de la estrategia empleada para la determinación no invasiva de trisomía del 21 fetal a través del análisis de sangre, suero o plasma materno por la cuantificación relativa de alelos de transcritos expresados en placenta localizados en el cromosoma 21. (A) fetos normales y con trisomía del 21 heterocigotos en un locus de SNP transcrito en el cromosoma 21. El feto con trisomía del 21 tiene una copia extra del gen. "A" y "G" indican los alelos respectivos del SNP transcrito. (B) El gen se expresa en tejidos placentarios y los transcritos resultantes son alélicos mostrando los SNP codificantes. Se espera que la relación de los dos alelos de ARN en la placenta con trisomía del 21 se desvíen de la de la placenta normal, debido a la
- 65 expresión de una copia extra del gen. (C) Los transcritos de ARN se liberan a la sangre materna y su abundancia

relativa refleja el perfil de expresión de genes placentarios. Por lo tanto, se espera que la relación en sangre, suero o plasma materno de los dos alelos de ARN en un embarazo con trisomía del 21 se desvíe de la de un embarazo normal.

5 **[0023] Figura 2.** Representaciones de cajas de concentraciones de transcritos de ARNm derivados de placenta en plasma materno de mujeres no embarazadas y mujeres en el primer y tercer trimestres de los embarazos, respectivamente. (A) ARNm de *COL6A1*. (B) ARNm de *SOD1*. (C) ARNm de *COL6A2* y (D) ARNm de *ATP5O*.  
 10 *Control*, mujeres no embarazadas; *1<sup>er</sup> trimestre*, mujeres el primer trimestre del embarazo; *3<sup>er</sup> trimestre*, mujeres en el tercer trimestre del embarazo. Las líneas dentro de las cajas indican las medianas. Las cajas marcan el intervalo entre los percentiles 25° y 75°. Las barras de error indican el intervalo entre los percentiles 10° y 90°. Los círculos rellenos marcan los puntos de datos fuera de los percentiles 10° y 90°.

**[0024] Figura 3.** eliminación de transcritos de ARNm derivados de placenta de plasma materno después del parto. Concentraciones de ARNm de (A) *COL6A1*, (B) *SOD1*, (C) *COL6A2* y (D) *ATP5O* en plasma materno antes y a las  
 15 24 horas después del parto. Cada línea representa una muestra de plasma emparejada obtenida de un sujeto.

**[0025] Figura 4.** Relaciones entre los dos alelos de transcritos para el SNP rs1053312 de gen *COL6A1* en tejidos placentarios. Las cantidades relativas entre los alelos de ARN se determinaron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real específica de alelos. Se ensayaron ARN de CVS normal (*CVS*), placentas de período normal (*PLN*) y placentas  
 20 con trisomía del 21 (*T21*). Las relaciones se calcularon por la diferencia en los valores de ciclo umbral ( $\Delta Ct$ ).

**[0026] Figura 5.** Relaciones entre los dos alelos de transcritos para el SNP rs2839114 del gen *COL6A2* en tejidos placentarios como se determina por RT-PCR cuantitativa en tiempo real específica de alelos. Se ensayaron ARN de CVS normal (*CVS*), placentas de período normal (*PLN*) y placentas con trisomía del 21 (*T21*). Las relaciones se  
 25 calcularon por (A) la diferencia en valores de ciclo umbral ( $\Delta Ct$ ) o (B) la diferencia de sus intensidades fluorescentes obtenidas en el último ciclo de PCR ( $\Delta \Delta Rn$ ).

**[0027] Figura 6.** Relaciones de frecuencias alélicas de SNP rs1053320 (*COL6A1*) en placentas de fetos con trisomía del 21 y normales heterocigotos determinadas por extensión de cebadores seguido de análisis de  
 30 espectrometría de masas. (A) ADN placentario. (B) ARN placentario.

**[0028] Figura 7.** Relaciones de frecuencias alélicas de SNP rs2839114 (*COL6A2*) en placentas de fetos con trisomía del 21 y normales heterocigotos determinadas por extensión de cebadores seguido de análisis de  
 35 espectrometría de masas. (A) ADN placentario. (B) ARN placentario.

**[0029] Figura 8.** Relaciones alélicas de transcritos de *PLAC4* en placentas de mujeres embarazadas que portan fetos normales y con trisomía del 21. Las relaciones alélicas se determinaron por extensión de cebadores seguido de análisis de espectrometría de masas usando SNP rs8130833.

40 **[0030] Figura 9.** Relaciones alélicas de transcritos de *PLAC4* en las muestras de plasma de mujeres embarazadas que portan fetos normales y con trisomía del 21.

**[0031] Figura 10.** Correlación de relaciones alélicas del transcrito de *PLAC4* de placentas y muestras de plasma maternas.  
 45

**[0032] Figura 11.** Comparación de la concentración de ARNm de *PLAC4* en plasma materno en embarazos con trisomía del 21 y control. Las cajas marcan el intervalo entre los percentiles 25° y 75°. Los bigotes indican el intervalo entre los percentiles 10° y 90°. Los círculos rellenos marcan los puntos de datos fuera de los percentiles 10° y 90°.

50 **[0033] Figura 12.** Relaciones alélicas de transcrito de *SERPINB2* en placentas de mujeres embarazadas que portan fetos normales y con trisomía del 18. Las relaciones alélicas se determinaron por extensión de cebadores seguido de análisis de espectrometría de masas usando SNP rs6098.

**[0034] Figura 13.** Relaciones alélicas de transcrito de *COL4A2* en placentas de mujeres embarazadas que portan  
 55 fetos normales y con trisomía del 13. Las relaciones alélicas se determinaron por extensión de cebadores seguido de análisis de espectrometría de masas usando SNP rs7990383.

## Descripción detallada de la invención

### 60 I. Definiciones

**[0035]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “trastorno cromosómico” habitualmente se refiere a un estado de anomalía cromosómica en el que el número de cromosomas no es un múltiplo exacto del número haploide habitual: frecuentemente, hay bien un cromosoma adicional o bien uno menos. En algunos casos, “trastorno  
 65 cromosómico” también puede referirse a un estado de anomalía cromosómica en la que una proporción de uno o

más cromosomas no es un múltiplo exacto del número haploide habitual, debido a, por ejemplo, translocación cromosómica. Un trastorno cromosómico habitual es la aneuploidía. Una forma habitual de aneuploidía cromosómica es una trisomía, en la que está presente un cromosoma adicional único. Por ejemplo, la trisomía del 18 es una anomalía cromosómica en la que se encuentra un tercer cromosoma 18 en una célula, mientras que está presente un tercer cromosoma 21 en las células de un paciente que padezca trisomía del 21. La translocación cromosómica (por ejemplo translocación entre el cromosoma 21 y 14 en la que parte del cromosoma 14° se reemplaza por un cromosoma 21° extra) puede provocar trisomía del 21 parcial.

**[0036]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “muestra biológica que contiene ARN” se refiere a una muestra biológica (tal como las que se analizan posteriormente) que contiene ácido ribonucleico (ARN). El ARN se refiere a un polímero de ribonucleótidos que tiene una secuencia correspondiente al menos a una parte de una localización preseleccionada en el genoma humano. El ARN como se usa en la presente memoria incluye, pero sin limitación, ARNm, ARN ribosómico y micro ARN. Los ARN pueden ser secuencias codificantes de proteínas tales como ARNm, o secuencias no codificantes tales como ARN ribosómico, microARN u otras secuencias transcritas sin funciones bien definidas. El ARNm es una molécula de ARN transcrita del ADN de un gen, y a partir de la cual se traduce una proteína por la acción de ribosomas. El ARN ribosómico (ARNr) es un ARN no codificante que no se traduce a una proteína. El micro ARN (miARN) es un subtipo de “ARN pequeños” que se distinguen por sus orígenes, no sus funciones. El micro ARN es de menos de 30 nucleótidos de longitud, y se transcribe de ADN pero no se traduce a proteína. Un experto en la materia apreciará que son útiles otros tipos de ARN en la presente invención.

**[0037]** Como se usa en la presente memoria, las expresiones “fetal”, “derivado de placenta” y “expresado en placenta” se refieren al origen de ciertas de ARN que son detectables en una muestra biológica de una mujer embarazada, por ejemplo, sangre. Por ejemplo, una especie de ARN fetal es una que se ha transcrito de una secuencia de ADN fetal. El ARN derivado de placenta o expresado en placenta es un tipo de ARN fetal. Un experto en la materia apreciará que son útiles otros ARN fetales en la presente invención. Una especie de ARN derivado de placenta o expresado en placenta es uno que se transcribe en la placenta.

**[0038]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “diferenciar alelos de ARN transcrito de al menos un locus genético de al menos un cromosoma de interés” se refiere a la detección y cuantificación de alelos de ARN particulares transcritos a partir de un locus genético particular en un cromosoma. La detección y cuantificación de alelos puede llevarse a cabo por una diversidad de métodos, incluyendo el uso de sondas de hibridación y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR). Otros métodos incluyen el uso de espectrometría de masas (MS), electroforesis, pirosecuenciación, micromatrices de extensión de cebadores, microplacas y secuenciación.

**[0039]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “relación de los alelos” se refiere a la relación de la población de un alelo y la población del otro alelo en una muestra biológica. En algunos casos, es posible que en trisomías un feto pueda ser tri-alélico para un locus particular. En tales casos, la expresión “relación de los alelos” se refiere a la relación de la población de un alelo cualquiera frente a uno de los otros alelos, o un alelo cualquiera frente a los otros dos alelos.

**[0040]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “control convencional” se refiere a una muestra adecuada para el uso de un método de la presente invención, para determinar la relación de los alelos de ARN-SNP transcritos de un locus genético particular, por ejemplo, *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2*, *ATP5O*, *BTG3*, *ADAMTS1*, *BACE2*, *ITSN1*, *APP*, *ATP5J*, *DSCR5*, *PLAC4*, *LOC90625*, *RPL17*, *SERPINB2* o *COL4A2*. Dicha muestra contiene una relación conocida de los alelos de ARN-SNP transcritos a partir de un locus genético particular que refleja estrechamente la relación media de dichos alelos de ARN-SNP en mujeres embarazadas que portan cada una un feto cromosómicamente normal. El control convencional también puede representar la relación media, la mediana de la relación u otra relación útil conocida por un experto en la materia. La determinación del control convencional se describe en más detalle posteriormente.

**[0041]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “mujeres embarazadas” se refiere a un grupo de mujeres embarazadas que portan cada una un feto cromosómicamente normal, y se refiere a ciertas características, tales como la relación de alelos de ARN transcritos a partir de los loci de interés, que son representativas de un grupo seleccionado aleatoriamente de mujeres que portan fetos cromosómicamente normales. Este grupo seleccionado debería comprender un número suficiente de mujeres de modo que el promedio, la media, la mediana u otra relación matemática, relación de alelos de ARN transcritos a partir de los loci de interés entre estas mujeres reflejen, con precisión razonable, la relación de alelos de ARN en la población general de mujeres embarazadas sanas con fetos sanos. La madre puede explorarse con respecto al riesgo de aneuploidía cromosómica fetal durante el primer trimestre de embarazo, aproximadamente las primeras 13 semanas de gestación. La madre también puede explorarse durante el segundo o tercer trimestre de gestación. El segundo trimestre de gestación es de aproximadamente 14 a aproximadamente 27 semanas de gestación. El tercer trimestre de gestación es de aproximadamente 28 semanas al final de la gestación, aproximadamente 40 semanas. Además, la edad gestacional preferida para ensayar también puede depender del marcador de ARN usado en el ensayo.

65

**[0042]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “cromosómicamente normal” se refiere al estado en el que el número de cromosomas es un múltiplo exacto del número haploide, tal como dos veces el número de cromosomas hallado en un haploide, y cada cromosoma está presente en el mismo número (excepto los cromosomas sexuales en el caso de, por ejemplo, seres humanos masculinos, en los que están presentes dos cromosomas sexuales diferentes, X y Y, en una copia cada uno).

**[0043]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “un aumento o una reducción de la relación del control convencional” se refiere a un cambio positivo o negativo en la relación en comparación con el control convencional. Un aumento es preferentemente al menos 10%, más preferentemente al menos 50% y más preferentemente al menos 100%. De forma similar una reducción es preferentemente al menos 10%, más preferentemente al menos 50% y más preferentemente al menos 90%. Además, el aumento o la reducción en la relación puede ser al menos 1 desviación típica del control convencional. El aumento o la reducción también puede ser al menos 2 desviaciones típicas del control convencional. El aumento o la reducción también puede ser al menos 3 desviaciones típicas del control convencional.

**[0044]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “polimorfismo de un único nucleótido” (SNP) se refiere a una variación de secuencia de ácido nucleico que implica alteración de un único nucleótido. Los SNP útiles en la presente invención incluyen los presentes en los transcritos de ARN correspondientes transcritos a partir de los loci genéticos de interés incluyendo, pero sin limitación, *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)*, *superóxido dismutasa 1 (SOD1)*, *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)*, *subunidad O de ATP sintasa mitocondrial (ATP5O)*, *familia BTG, miembro 3 (BTG 3)*, *motivo de tipo desintegrina a y metaloproteasa (tipo reprotisina) con trombospondina tipo 1, 1 (ADAMTS1)*, *enzima de escisión de APP en sitio beta 2 (BACE2)*, *intersectina 1 (ITSN1)*, *proteína precursora de beta amiloide (A4) (APP)*, *ATP sintasa, complejo F0 mitocondrial transportador de H<sup>+</sup>, subunidad F6 (ATP5J)*, *gen 5 de región crítica de síndrome de Down (DSCR5)*, *específico de placenta 4 (PLAC4)*, *proteína hipotética BC005107 (LOC90625)*, *proteína ribosómica L17 (RPL17)*, *inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) miembro 2 (SERPINB2)* y *colágeno de tipo IV alfa 2 (COL4A2)*. Tales SNP se denominan ARN-SNP puesto que implican la alteración de un único nucleótido en ARN. Después se usan alelos de los ARN-SNP en la presente invención para determinar una relación de los alelos de ARN-SNP en una muestra biológica obtenida de una mujer embarazada y para comparar esa relación con la relación obtenida de muestras biológicas obtenidas de un grupo de mujeres embarazadas cada una con un feto normal. Un experto en la materia apreciará que también son útiles otros marcadores y polimorfismos de inserción/delección en la presente invención.

**[0045]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “sangre materna” se refiere a una muestra de sangre o preparación de una mujer embarazada o una mujer que se somete a una prueba de posible embarazo. La expresión abarca sangre completa o cualquier fracción de sangre. Los ejemplos de “sangre materna” incluyen plasma y suero. Una muestra de sangre materna que está esencialmente libre de células también se denomina “acelular”, en la que generalmente no están presentes plaquetas.

**[0046]** Como se usa en la presente memoria, la expresión “elementos celulares o residuos celulares” se refiere a partes de células que permanecen en la muestra biológica, incluyendo, pero sin limitación, plaquetas, cuerpos apoptóticos y micropartículas de sincitiotrofoblastos.

## II. Métodos de la presente invención

**[0047]** La presente invención usa la especificidad de embarazo de transcritos expresados en fetos para desarrollar un método que permita la determinación genética de la aneuploidía cromosómica fetal y de este modo el establecimiento de su diagnóstico de forma no invasiva. En una realización, los transcritos expresados en fetos son los expresados en la placenta. Específicamente, la presente invención detecta polimorfismos de un único nucleótido (SNP) de transcritos de ARN con patrones de expresión específicos de tejido que se codifican por genes en el cromosoma aneuploide. Otros polimorfismos también son detectables por los métodos de la presente invención, tales como un polimorfismo de inserción/delección y un polimorfismo de repetición en tándem sencilla. El estado del locus se determina a través de la evaluación de la relación entre SNP informativos en el ARN transcrito de los loci genéticos de interés. Brevemente, la presente invención compara la relación entre alelos de un sitio polimórfico en transcritos de ARN específicos de locus y de tejido de un feto aneuploide con un feto euploide.

**[0048]** La presente invención, por lo tanto, puede aplicarse al diagnóstico prenatal de la trisomía del 21 que implica el análisis de SNP informativos en transcritos de ARN con expresión en tejido placentario que derivan de loci en el cromosoma 21. La trisomía del 21 fetal se determina después comparando las relaciones entre los SNP informativos a través de la detección de los transcritos de ARN expresados en placenta en sangre materna. La especificidad fetal de los marcadores en sangre materna se confiere por su expresión en tejido placentario, mientras que el estado aneuploide se determina por las relaciones anómalas entre los SNP informativos en los transcritos de ARN.

**[0049]** Los métodos de la presente invención permiten la determinación genética de la trisomía del 21 fetal y su diagnóstico prenatal basándose en el análisis de ARN-SNP expresados en placenta codificados por loci genéticos en el cromosoma 21. Los alelos de ARN-SNP pueden diferenciarse, por ejemplo, mediante ensayos de QRT-PCR en

tiempo real y se determina la relación entre ellos, que es indicativa de la dosificación genética del locus. En otra realización, pueden diferenciarse los alelos de ARN-SNP por extensión de cebadores seguido de espectrometría de masas.

## 5 A. Trastornos cromosómicos detectables usando los métodos de la presente invención

[0050] La presente invención proporciona métodos para la detección de aneuploidías cromosómicas tales como trisomía del 21. Los métodos también permiten la detección de otras aneuploidías fetales, tales como las presentes en, o que implican, los cromosomas 18, 13, X y Y. Los métodos también permiten la detección no invasiva de aneuploidía cromosómica fetal cuando se analiza la sangre materna. La utilidad de la detección de ARN-SNP se extiende más allá de la detección de anomalías cromosómicas a la detección de otras variaciones genéticas del feto, por ejemplo polimorfismos y mutaciones heredadas de los padres.

## B. Muestras biológicas útiles en la presente invención para detectar trastornos cromosómicos fetales

[0051] La primera etapa de la práctica de la presente invención es obtener una muestra biológica de una mujer embarazada en una edad gestacional adecuada para ensayar usando un método de la presente invención, o de una mujer que se está realizando pruebas para posible embarazo. La edad gestacional adecuada puede variar dependiendo del trastorno ensayado y en ocasiones el marcador de ARN usado, como se ha analizado anteriormente.

[0052] La muestra biológica puede ser sangre materna, incluyendo plasma o suero materno. En algunas circunstancias, la muestra biológica es acelular. En otras circunstancias, la muestra biológica contiene elementos celulares o residuos celulares en sangre materna. Otras muestras biológicas incluyen líquido amniótico, muestra de vellosidad del corion, material de biopsia de un embrión pre-implantación, orina materna, saliva materna, una muestra de celocentesis, células nucleadas fetales o residuos celulares fetales, o la muestra obtenida de lavados del tracto reproductivo femenino.

[0053] Cuando la muestra biológica es sangre, se realiza recogida de sangre de una mujer de acuerdo con los protocolos convencionales que siguen generalmente los hospitales o clínicas. Se recoge una cantidad apropiada de sangre periférica, por ejemplo, entre 3 y 20 ml, y puede almacenarse de acuerdo con procedimientos convencionales antes de preparación adicional.

[0054] Las muestras biológicas útiles en la presente invención contienen ARN fetal. El ARN fetal puede transcribirse de los cromosomas 21, 18, 13, X y Y. Además el nivel al que se expresa el ARN en la placenta puede ser dos veces, cinco veces o diez veces o más el nivel expresado en la sangre materna o sus diversas fracciones.

[0055] El ARN fetal deriva típicamente de cualquier tejido de origen fetal incluyendo, pero sin limitación, la placenta y puede ser ARNm. El ARN puede extraerse de la muestra biológica por una diversidad de métodos. Pueden seguirse los métodos generales de preparación de ARN (por ejemplo, descritos por Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª ed., 2001); también pueden usarse diversos reactivos o kits disponibles en el mercado, tales como reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), Kits de ARNm Oligotex Directo (Qiagen, Valencia, CA), Mini Kits de RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) y PolyATtract® Serie 9600™ (Promega, Madison, WI), para obtener ARN de una muestra de sangre de una mujer. También pueden usarse combinaciones de más de uno de estos métodos. Debería usarse manipulación cuidadosa de las muestras, tratamiento exhaustivo con DNasa y controles negativos apropiados en las etapas de amplificación y cuantificación para eliminar ADN de las preparaciones de ARN.

## C. Métodos para diferenciar alelos de transcritos de ARN

[0056] La diferenciación de los alelos de transcritos de ARN puede conseguirse por una diversidad de métodos, incluyendo PCR, espectrometría de masas (MS), electroforesis en gel, pirosecuenciación, ensayos de extensión de cebadores, microplacas, secuenciación e hibridación con una o más sondas fluorescentes.

### 55 1. Diferenciación de alelos de ARN-SNP basada en PCR

[0057] Una vez que se ha extraído ARN de la muestra biológica, puede evaluarse la cantidad de cada alelo de SNP particular del ARN de interés, por ejemplo, *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2*, *ATP5O*, *BTG3*, *ADAMTS1*, *BACE2*, *ITSN1*, *APP*, *ATP5J*, *DSCR5*, *PLAC4*, *LOC90625*, *RPL17*, *SERPINB2* o *COL4A2*.

[0058] También son útiles variantes del gen seleccionado en la presente invención. Por ejemplo, las variantes útiles del gen *PLAC4* incluyen variantes identificadas por los números de referencia de GenBank: AF269287, AK027868, AK092431, BC093685, BC101615, BC101617, L13197, NM\_182832 y LOC191585. El ARN transcrito del locus genético del gen *PLAC4* contiene uno o más polimorfismos de un único nucleótido, o polimorfismo de inserción-delección. Los polimorfismos ejemplares transcritos del gen *PLAC4* incluye, pero sin limitación,



polimorfismos identificados por la base de datos de números de referencia de SNP ((dbSNP) [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)) (con coordenadas de *PLAC4* basadas en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el Buscador de Genoma de UCSC ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/))): rs3804026 (*PLAC4-41469163*), rs4818219 (*PLAC4-41469764*), rs9977003 (*PLAC4-41470591*), rs7844 (*PLAC4-41470699*), rs9015 (*PLAC4-41470877*),  
 5 rs13643 (*PLAC4-41471296*), rs9305729 (*PLAC4-41472272*), rs9305730 (*PLAC4-41472277*), rs5019195 (*PLAC4-41473295*), rs5019194 (*PLAC4-41473302*), rs5844069 (*PLAC4-41473306*), rs1049904 (*PLAC4-41473392*),  
 rs16998089 (*PLAC4-41473496*), rs12482116 (*PLAC4-41475590*), rs11909439 (*PLAC4-41475912*), rs7278659  
 (*PLAC4-41476875*), rs12106409 (*PLAC4-41477273*), rs12106395 (*PLAC4-41477340*), rs12106401 (*PLAC4-41477425*),  
 10 rs12106434 (*PLAC4-41477486*), rs2183584 (*PLAC4-41477956*), rs3949725 (*PLAC4-41478283*),  
 rs8130833 (*PLAC4-41478755*), rs10222145 (*PLAC4-41480512*) y rs9981478 (*PLAC4-41480564*), u otros polimorfismos localizados dentro del locus del gen *PLAC4* tales como *PLAC4-41471145* y *PLAC4-41476236*, que se localizan en las coordenadas de nucleótidos de 41471145 y 41476236, respectivamente, en el cromosoma 21 basándose en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el Buscador de Genoma de UCSC ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)). Los expertos en la materia apreciarán que también son útiles otros polimorfismos en *PLAC4* en  
 15 la presente invención.

**[0059]** Los números de referencia de dbSNP se refieren solamente a la parte de SNP de la secuencia genómica en la que se localiza el SNP. El alcance de la secuencia proporcionada para el SNP puede seleccionarse para las partes tanto cadena arriba como cadena abajo de la secuencia genómica transcrita.

**[0060]** Otros ARN-SNP útiles en la presente invención incluyen <sup>Arg850<sub>His</sub></sup> de *COL6A1* (*COL6A1-46247817*), <sup>Ser932<sub>Ser</sub></sup> de *COL6A1* (*COL6A1-46248064*) y <sup>Val728<sub>Val</sub></sup> de *COL6A2* (*COL6A2-46370341*), en el cromosoma 21 basándose en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el Buscador de Genoma de UCSC ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)).

**[0061]** En la mayoría de los casos, es deseable amplificar la secuencia diana usando cualquiera de varios procedimientos de amplificación de ácido nucleico que se conocen bien en la técnica (enumerados anteriormente y descritos en más detalle posteriormente). Específicamente, la amplificación de ácido nucleico es la síntesis enzimática de amplicones de ácido nucleico (copias) que contienen una secuencia que es complementaria de una secuencia de ácido nucleico que se amplifica. La amplificación de ácido nucleico es especialmente beneficiosa cuando la cantidad de secuencia diana presente en una muestra es muy baja. Amplificando las secuencias diana y detectando el amplicón sintetizado, la sensibilidad de un ensayo puede mejorarse ampliamente, puesto que son necesarias menos secuencias diana al comienzo del ensayo para asegurar mejor la detección de ácido nucleico en la muestra que pertenece al organismo o virus de interés.

**[0062]** La amplificación de polinucleótidos utiliza métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por ligación (o reacción en cadena de la ligasa (LCR)) y métodos de amplificación basados en el uso de Q-beta replicasa. También son útiles amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), SDA termófila, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (3SR o NASBA) y amplificación asociada con transcripción (TAA). Estos métodos se conocen bien y se practican ampliamente en la técnica. Están disponibles en el mercado reactivos y soportes físicos para realizar PCR.

**[0063]** Antes de la etapa de amplificación, típicamente es necesario sintetizar una copia de ADN (ADNc) del transcrito de ARN de interés. Esto se consigue por transcripción inversa, que puede llevarse a cabo como una etapa separada, o en una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa homogénea (RT-PCR), una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar ARN. Se describen métodos adecuados para amplificación por PCR de ácidos ribonucleicos por Romero y Rotbart en *Diagnostic Molecular Biology Principles and Applications* pp. 401-406; Persing *et al.*, eds., Mayo Foundation, Rochester, MN, 1993; Egger *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 33: 1442-1447, 1995; y Patente de Estados Unidos N° 5.075.212.

**[0064]** Los métodos generales de PCR se conocen bien en la técnica y por lo tanto no se describen en detalle en la presente memoria. Para una revisión de métodos de PCR, protocolos y principios en el diseño de cebadores, véase, por ejemplo, Innis, *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y., 1990. También están disponibles reactivos y protocolos de PCR de distribuidores comerciales, tales como Roche  
 55 Molecular Systems.

**[0065]** La PCR se lleva a cabo habitualmente como un procedimiento automático con una enzima termoestable. En este procedimiento, la temperatura de la mezcla de reacción se somete a un ciclo a través de una región de desnaturalización, una región de hibridación de cebadores y una región de reacción de extensión automáticamente. Están disponibles en el mercado máquinas adaptadas específicamente para este fin.

**[0066]** Los cebadores útiles para amplificar las secuencias de transcritos de ARN son preferentemente complementarios de, e hibridan específicamente con secuencias que flanquean una región diana en las mismas. Las secuencias de polinucleótidos generadas por amplificación pueden secuenciarse directamente. Como alternativa, la secuencia o las secuencias amplificadas pueden clonarse antes del análisis de secuencia. Como una tercera  
 65

posibilidad, pueden diseñarse cebadores que solapen con el sitio de SNP para la práctica de PCR específica de alelos. La PCR específica de alelos permite la diferenciación de alelos de ARN-SNP ya que solo se amplificarán los cebadores hibridados correctamente. Los cebadores de PCR se refieren a oligonucleótidos que pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una secuencia de nucleótidos originada de una especie de ARN transcrito de un locus de interés, tal como *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2*, *ATP5O*, *BTG3*, *ADAMTS1*, *BACE2*, *ITSN1*, *APP*, *ATP5J*, *DSCR5*, *PLAC4*, *LOC90625*, *RPL17*, *SERPINB2* o *COL4A2*. Al menos uno de los cebadores de PCR para amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un transcrito nombrado anteriormente debería ser específico de secuencia para el locus.

- 10 **[0067]** Aunque la amplificación por PCR de los alelos de ARN-SNP diana se usa típicamente en la práctica de la presente invención, un experto en la materia reconocerá que la amplificación de la especie de ARN en una muestra de sangre materna puede conseguirse por cualquier método conocido, tal como reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción y replicación de secuencia auto-sostenida o amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), cada una de las cuales proporciona suficiente amplificación. También puede usarse la tecnología de ADN ramificado más recientemente desarrollada para amplificar la señal de marcadores de ARN en sangre materna. Para una revisión de amplificación de señal por ADN ramificado (ADNr) para cuantificación directa de secuencias de ácido nucleico en muestras clínicas, véase Nolte, *Adv. Clin. Chem.* 33: 201-235, 1998.

## 2. Otros métodos para la diferenciación de alelos de ARN-SNP

- 20 **[0068]** Los alelos de ARN-SNP de interés también pueden detectarse usando otras técnicas convencionales, bien conocidas por los expertos en la materia. Aunque la etapa de detección está típicamente precedida de una etapa de amplificación, no se requiere amplificación en los métodos de la invención. Por ejemplo, el transcrito de ARN puede identificarse por fraccionamiento por tamaño (por ejemplo, electroforesis en gel), precedida o no de una etapa de amplificación. Después de procesar una muestra en un gel de agarosa o poliacrilamida y marcar con bromuro de etidio de acuerdo con técnicas bien conocidas (véase, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª ed., 2001), la presencia de una banda del mismo tamaño como el control convencional es un indicio de la presencia de una secuencia de ARN diana, la cantidad de la cual puede después compararse con el control basándose en la intensidad de la banda. Como alternativa, pueden usarse sondas oligonucleotídicas específicas de ARN que codifica, por ejemplo, *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2*, *ATP5O*, *BTG3*, *ADAMTS1*, *BACE2*, *ITSN1*, *APP*, *ATPSJ*, *DSCR5*, *PLAC4*, *LOC90625*, *RPL17*, *SERPINB2* o *COL4A2*, para detectar la presencia de tales especies de ARN e indicar la cantidad de moléculas de ARN en comparación con el control convencional, basándose en la intensidad de señal transmitida por la sonda.

- 35 **[0069]** La hibridación de sondas específicas de secuencia es un método bien conocido para detectar un ácido nucleico particular que comprende otras especies de ácido nucleico. En condiciones de hibridación suficientemente rigurosas, las sondas hibridan específicamente solamente con secuencias sustancialmente complementarias. La rigurosidad de las condiciones de hibridación puede relajarse para tolerar diversas cantidades de emparejamientos erróneos de secuencia.

- 40 **[0070]** Varios formatos de hibridación bien conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación, ensayos de hibridación de fase de solución, fase sólida o fase mixta. Los siguientes artículos proporcionan una visión de conjunto de los diversos formatos de ensayo de hibridación: Singer *et al.*, *Biotechniques* 4: 230, 1986; Haase *et al.*, *Methods in Virology*, pp. 189-226, 1984; Wilkinson, *In situ Hybridization*, Wilkinson ed., IRL Press, Oxford University Press, Oxford; y Hames y Higgins eds., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, 1987.

- [0071]** Los complejos de hibridación se detectan de acuerdo con técnicas bien conocidas y la detección no es un aspecto típico de la presente invención. Pueden marcarse sondas de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con un ácido nucleico diana, es decir, el ARNm o el ADN amplificado, por cualquiera de varios métodos típicamente usados para detectar la presencia de ácidos nucleicos hibridados. Un método habitual de detección es el uso de autorradiografía usando sondas marcadas con <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P, o similares. La elección de isótopo radioactivo depende de preferencias de investigación debido a la facilidad de síntesis, estabilidad y semividas de los isótopos seleccionados. Otros marcadores incluyen compuestos (por ejemplo, biotina y digoxigenina), que se unen a antilíngandos o anticuerpos marcados con fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y enzimas. Como alternativa, las sondas pueden conjugarse directamente con marcadores tales como fluoróforos, agentes quimioluminiscentes o enzimas. La elección de marcador depende de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con la sonda, requisitos de estabilidad e instrumentación disponible.

- [0072]** Las sondas y cebadores necesarios para practicar la presente invención pueden sintetizarse y marcarse usando técnicas bien conocidas. Los oligonucleótidos usados como sondas y cebadores pueden sintetizarse químicamente de acuerdo con el método de triéster de fosoramidita de fase sólida descrito en primer lugar por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862, 1981, usando un sintetizador automático, como se describe en Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168, 1984. La purificación de oligonucleótidos es bien por electroforesis en gel de acrilamida nativo o bien por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de intercambio de aniones como se describe en Pearson y Regnier, *J. Chrom.*, 255:137-149,

1983.

**[0073]** Otros métodos útiles para diferenciar alelos de transcritos de ARN incluyen secuenciación directa, tal como pirosecuenciación. El procedimiento de pirosecuenciación implica un complejo de cebador-molde en el que cada uno de los cuatro desoxinucleótido trifosfato se añaden uno cada vez. Cuando se incorpora el desoxinucleótido trifosfato por la ADN polimerasa, se emite luz. La cantidad de luz generada es proporcional al número de bases añadidas. En consecuencia, puede inferirse la secuencia cadena abajo.

**[0074]** La reacción de extensión de cebadores también es útil en la presente invención. La reacción de extensión de cebadores actúa diferenciando los alelos de SNP mediante la incorporación de desoxinucleótidos y/o didesoxinucleótidos a un cebador de extensión de cebadores que hibrida con una región adyacente al sitio de SNP. El cebador se extiende con una polimerasa. El SNP con cebador extendido puede detectarse físicamente por espectrometría de masas o por un resto marcador tal como una biotina. Como el sitio de SNP se extiende solamente por un desoxinucleótido o didesoxinucleótido complementario que está bien marcado por un marcador específico o bien genera un producto de extensión de cebadores con una masa específica, los alelos de SNP pueden diferenciarse.

**[0075]** Los métodos de espectrometría de masas permiten la detección de un polinucleótido, por ejemplo un amplicón de PCR o un producto de extensión de cebadores. La presencia de la secuencia de polinucleótido se verifica comparando la masa de la señal detectada con la masa esperada del polinucleótido de interés. Las fuerzas de señal relativas para una secuencia de polinucleótido particular indica la población relativa de un alelo específico, permitiendo de este modo el cálculo de la relación de alelos directamente a partir de los datos. Para una revisión de métodos de genotipación por espectrometría de masas, véase Pusch *et al.*, *Pharmacogenomics* 3:537-548, 2002.

#### 25 D. Determinar la relación de alelos de ARN-SNP

**[0076]** En general, la determinación de la relación de los alelos de ARN-SNP implica calcular la población relativa de cada alelo de ARN-SNP que está presente en la muestra, y dividir el valor determinado para un alelo de ARN-SNP por el valor para el otro alelo de ARN-SNP. El uso de un sistema de detección basado en PCR implica dividir la intensidad del marcador asociada con los productos de PCR, extensión de cebadores o reacción de hibridación generados a partir de uno de los alelos con la del otro alelo del transcrito de ARN. Otros métodos para determinar la relación de alelos de ARN-SNP incluyen comparar la abundancia de productos de secuenciación o el número de secuencias clonadas para cada uno de los alelos. La relación de ARN-SNP también puede determinarse comparando las intensidades de señal de masa de los alelos por espectrometría de masas.

**[0077]** Como alternativa, la relación de ARN-SNP puede determinarse a partir de la diferencia en la intensidad de fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) acumulada para cada alelo durante una reacción, o a partir del número de ciclos de PCR requeridos para que una reacción de cada alelo haya acumulado una intensidad de fluorescencia umbral (Ct). La  $\Delta Ct$  y  $\Delta \Delta R_n$  son representativas de la relación de alelos de ARN-SNP porque estos valores son proporcionales al logaritmo de la cantidad del alelo de ARN. Como resultado, la diferencia en los valores de ciclo umbral ( $\Delta Ct$ ) o la diferencia en las intensidades de fluorescencia acumulada ( $\Delta \Delta R_n$ ) para cada alelo es representativa de la relación de SNP para un transcrito de ARN. Por ejemplo, el alelo A puede detectarse con una sonda marcada con FAM (6-carboxifluoresceína) y el alelo B puede detectarse con una sonda fluorescente tal como VIC (de Applied Biosystems). Los valores de Ct y  $\Delta R_n$  se calculan para cada uno del alelo A y el alelo B. La diferencia de los dos valores de Ct se determina usando valores de ciclo umbral y proporciona el valor  $\Delta Ct$ . La diferencia en los dos valores de  $\Delta R_n$  se determina usando las intensidades de fluorescencia acumuladas y proporciona el valor de  $\Delta \Delta R_n$ . Como los valores de Ct y  $\Delta R_n$  están logarítmicamente relacionados con la abundancia de productos de PCR, se calcula la diferencia en los valores de Ct y  $\Delta R_n$  para cada ARN-SNP y esa diferencia (los valores de  $\Delta Ct$  y  $\Delta \Delta R_n$ ) es representativa de la relación de ARN-SNP entre los dos alelos de ARN.

#### 50 E. Comparación de la relación de ARN-SNP con un control convencional

**[0078]** Una vez que se ha determinado la relación de alelos en el sujeto, la relación se compara con el control convencional para determinar la presencia de aneuploidía fetal. Una relación de ARN-SNP que sea mayor o menor en comparación con un valor conocido determinado en la muestra de control, indica la presencia de una aneuploidía fetal. Por ejemplo, un valor de  $\Delta Ct$ , valor de  $\Delta \Delta R_n$  o el marcador o las relaciones de intensidad de masas entre los alelos de SNP que sea mayor o menor en comparación con un valor conocido determinado en la muestra de control, indica la presencia de una aneuploidía fetal.

**[0079]** Para establecer un control convencional, se selecciona en primer lugar un grupo de mujeres embarazadas sanas que portan fetos sanos. Estas mujeres son preferentemente, pero no necesariamente, de edad gestacional similar, lo que está dentro del período de tiempo apropiado de embarazo para explorar afecciones tales como aneuploidía cromosómica fetal usando los métodos de la presente invención. De forma similar, se establece un control convencional usando muestras de un grupo de mujeres no embarazadas sanas. El estado sano de las

mujeres embarazadas seleccionadas y los fetos que portan se confirma por métodos bien establecidos, empleados habitualmente incluyendo, pero sin limitación, análisis citogenético o realizando análisis genéticos fetales usando los métodos descritos anteriormente para obtener una muestra biológica. El control convencional puede determinarse antes de ensayar con respecto a la presencia de aneuploidía fetal.

5

**[0080]** Además, el grupo seleccionado de mujeres embarazadas sanas que portan fetos sanos debe ser de un tamaño razonable, de modo que el promedio, la media o la mediana de la relación de alelos de ARN-SNP que codifican *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2*, *ATP5O*, *BTG3*, *ADAMTS1*, *BACE2*, *ITSN1*, *APP*, *ATP5J*, *DSCR5*, *PLAC4*, *LOC90625*, *RPL17*, *SERPINB2* o *COL4A2*, calculados a partir del grupo puedan considerarse razonablemente representativos de la cantidad normal o promedio, media o su mediana entre la población general de mujeres sanas que portan fetos sanos. En algunos casos, el grupo comprende al menos 10 mujeres.

10

**[0081]** Una vez que se ha establecido un valor medio para la relación de alelos de ARN-SNP basándose en los valores individuales hallados en cada mujer del grupo seleccionado, este valor se considera un patrón para las especies de ARN. Cualquier muestra de sangre que contenga una relación similar de ARN de la misma especie puede usarse por lo tanto como control convencional. También puede ensamblarse artificialmente una solución que contenga ARN que codifique *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2*, *ATP5O*, *BTG3*, *ADAMTS1*, *BACE2*, *ITSN1*, *APP*, *ATP5J*, *DSCR5*, *PLAC4*, *LOC90625*, *RPL17*, *SERPINB2* o *COL4A2*, con una relación de la media establecida de la misma especie y actuar como un control convencional.

15

**[0082]** Un aumento de la relación de ARN-SNP que sea al menos 10% mayor en comparación con el valor medio en la muestra de control, indica un mayor riesgo de tener un feto con trastorno cromosómico. En algunos casos, el aumento de la relación de ARN-SNP es al menos 50% mayor. En otros casos, el aumento de la relación de ARN-SNP es al menos 100% mayor. En otros casos más, una relación de ARN-SNP que sea al menos 10% menor en comparación con el valor medio en la muestra de control, indica un mayor riesgo de tener un feto con un trastorno cromosómico. En algunos otros casos, la reducción es al menos de 50% o al menos de 90%.

20

**[0083]** Una relación de ARN-SNP que sea al menos una desviación típica mayor o menor que el valor medio en la muestra de control indica un mayor riesgo de tener un feto con un trastorno cromosómico. Una relación de ARN-SNP que sea al menos dos desviaciones típicas mayor o menor que el valor medio en la muestra de control indica un mayor riesgo de tener un feto con un trastorno cromosómico. Una relación de ARN-SNP que sea al menos tres desviaciones típicas mayor o menor que el valor medio en la muestra de control indica un mayor riesgo de tener un feto con un trastorno cromosómico. En algunos casos, una relación de ARN-SNP que sea menor de una desviación típica mayor o menor que el valor medio en la muestra de control también indicará un mayor riesgo de tener un feto con un trastorno cromosómico.

25

#### **F. Kits para detectar un trastorno cromosómico en un feto de una mujer embarazada**

**[0084]** La presente invención también proporciona kits para detectar la presencia de un feto que tenga un trastorno cromosómico. Los kits de la presente invención incluyen cebadores para amplificar la región de interés. Los cebadores útiles en los kits de la presente invención se describen anteriormente para la diferenciación de alelos. Los cebadores pueden ser específicos para un marcador o actuar de una manera no específica.

30

**[0085]** Otro componente de los kits de la presente invención es un control convencional que representa la relación de los alelos de ARN en mujeres embarazadas promedio con un feto cromosómicamente normal. El control convencional se determina de la misma manera que la descrita anteriormente para los métodos de detectar el trastorno cromosómico en el feto de una mujer embarazada.

35

**[0086]** Los kits de la presente invención también pueden comprender sondas de hibridación para diferenciar los diferentes alelos de cada especie de ARN. Los alelos de cada especie de ARN pueden ser polimorfismos de un único nucleótido, polimorfismos de inserción/delección o polimorfismos de repetición en tándem sencilla. Las sondas de hibridación útiles en los kits de la presente invención son las mismas sondas de hibridación usadas para los métodos para detectar el trastorno cromosómico en el feto de una mujer embarazada. Las sondas de hibridación pueden ser radiactivas, fluorescentes, quimioluminiscentes o enzimáticas. Los oligonucleótidos usados como sondas pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas (Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862, 1981, usando un sintetizador automático, como se describe en Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168, 1984). Las sondas de la presente invención pueden ser específicas o no específicas. Un experto en la materia reconocerá que son útiles otros métodos de diferenciación de los alelos de cada especie de ARN en los kits de la presente invención, tales como los métodos descritos anteriormente.

40

**[0087]** Los kits de la presente invención pueden comprender elementos adicionales que un experto en la materia apreciará que son útiles en los kits de la presente invención.

45

**[0088]** Los siguientes ejemplos se proporcionan como ilustración solamente y no como limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse

50

para producir resultados esencialmente similares.

### III. Ejemplos

5 **[0089]** Los métodos de la presente invención son útiles para detectar trastornos cromosómicos en individuos que son heterocigotos para un locus genético particular, para detectar si los individuos tienen un número anómalo de cromosomas en ese locus particular, por ejemplo, un 3 anómalo en lugar del 2 normal. En el caso de embarazo, aunque la muestra biológica se toma directamente de la mujer embarazada, el individuo que se ensaya con respecto a la aneuploidía cromosómica es el feto que porta la mujer embarazada. En una realización de la aplicación de este enfoque para el diagnóstico prenatal, la copia extra del gen se expresa junto con el par génico normal en tejidos placentarios. La relación de los alelos de ARN en la placenta se desvía de la de la placenta normal como resultado de la copia extra del gen. Los transcritos de ARN se liberan después a la sangre materna, y su abundancia relativa es representativa del perfil de expresión génica placentario. En consecuencia, la relación de los alelos de ARN en la sangre o sus fracciones (por ejemplo, plasma) de la mujer embarazada que porta un feto que tiene un trastorno cromosómico, se desvía de la de una mujer embarazada que porta un feto euploide (Figura 1).

20 **[0090]** La detección de un trastorno cromosómico usando los alelos de ARN requiere la identificación de un marcador que sea específico para el feto y esté presente a niveles de expresión detectables en la sangre de la madre, identificación de una región transcrita en ese marcador que tenga alta expresión placentaria, la capacidad para detectar el transcrito en la sangre de la madre, determinación de que los transcritos sean específicos de embarazo, y determinación de la relación alélica de los transcritos para evaluar la presencia o ausencia del trastorno cromosómico.

25 **[0091]** Los ejemplos posteriores demuestran ejemplos específicos para identificar marcadores y transcritos útiles, métodos para detectar los transcritos y asegurar que los transcritos sean específicos de embarazo, y métodos para cuantificar los transcritos y determinar la relación de alelos de ARN para detectar un trastorno cromosómico. Un experto en la materia reconocerá que también son útiles otros métodos y técnicas en la práctica de la presente invención.

#### 30 **Ejemplo 1: identificación de snps útil para detectar trisomía del 21 en fetos**

**[0092]** La identificación de SNP útiles para la detección de trisomía del 21 fetal requiere la identificación de una especie de ARN que se exprese por células fetales y esté presente en concentraciones detectables en las muestras biológicas analizadas.

#### 35 Identificación de transcritos específicos fetales con niveles de expresión placentaria altos

40 **[0093]** Se obtuvieron perfiles de expresión génica de cinco muestras de muestra de la velloidad del corion (CVS) de primer trimestre por análisis de micromatrices de cada muestra tisular individual. En un intento de identificar transcritos expresados en placenta entre las moléculas de ARN en circulación en el plasma materno, se obtuvieron los perfiles de expresión génica de sangre completa materna (específicamente células hematopoyéticas maternas) y se compararon con los de los tejidos placentarios correspondientes. Los transcritos expresados en placenta en embarazo temprano se identificaron seleccionando transcritos cuyos niveles de expresión aumentaban en los tejidos de CVS, en comparación con las muestras de sangre completa correspondientes en las cinco comparaciones.

45 **[0094] *Procesamiento de muestras y extracción de ARN.*** Se obtuvieron cinco muestras de tejido placentario de primer trimestre de mujeres embarazadas por CVS antes de terminaciones terapéuticas. Se confirmó posteriormente que el cariotipo fetal en todos los casos era normal. Las muestras de tejido placentario se almacenaron en RNAlater™ (Ambion®, Austin, TX) inmediatamente después de su recogida y se mantuvieron a -80 °C hasta la extracción de ARN. Se recogieron seis mililitros de sangre periférica materna simultáneamente con el momento de recogida de tejido y se almacenaron en tubos de ARN en sangre PAXgene™ (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Suiza). Se extrajo ARN total de tejidos placentarios con el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificaron con mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo los protocolos del fabricante. Se extrajo ARN total de sangre periférica por kit de ARN en sangre PAXgene™ (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la inclusión de tratamiento por DNasa (Set de DNasa sin RNasa, Qiagen, Hilden, Alemania).

60 **[0095] *Análisis de expresión génica por matrices de oligonucleótidos de alta densidad.*** Para cada muestra, se marcaron diez microgramos del ARN extraído y se hibridaron con las matrices de genoma humano U133A y U133B GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la hibridación, cada matriz se lavó y se tiñó en una estación de fluidos 400 GeneChip® (Affymetrix). Las microplacas se exploraron con el explorador GeneArray (Affymetrix) y se analizaron usando el programa de micromatrices de GeneChip® 5.0 (Affymetrix). Se seleccionaron transcritos que se expresaban predominantemente en tejidos placentarios en lugar de sangre periférica materna y derivaban del cromosoma 21. De los 7226 transcritos génicos expresados en las muestras de CVS, se identificó que 1245 transcritos tenían mayor expresión en la CVS que las

muestras de sangre periférica materna. Entre este panel de transcritos, se identificaron 13 genes expresados en placenta localizados en el cromosoma 21 (Tabla 1)

[0096]

5

**Tabla 1.** Detección de micromatrices de genes expresados en placenta localizados en el cromosoma 21. Los transcritos se clasifican en orden descendiente de acuerdo con la mediana de las señales de micromatrices respectivas

ID de conjunto de sondas	Secuencia derivada de	Transcritos	Símbolo	Localización	* Señal (mediana)
213428_s_at	AA292373	Colágeno, tipo VI, alfa 1	COL6A1	q22.3 21	8419,2
200642_at	NM_000454.1	superóxido dismutasa 1, soluble (esclerosis lateral amiotrófica 1 (adulto))	SOD1	21q22.11	7084,7
209156_s_at	AY029208.1	colágeno, tipo VI, alfa 2	COL6A2	21q22.3	7076,9
200818_at	NM_001697.1	ATP sintasa, complejo F1 mitocondrial transportador de H+, subunidad O (proteína que confiere sensibilidad a oligomicina)	ATP5O	21q22.11	3247,8
213134_x_at	AI765445	Familia BTG, miembro 3	BTG3	21 q21.1	2564,9
214953_s_at	X06989.1	proteína precursora de beta amiloide (A4) (proteasa nexina-II, enfermedad de Alzheimer)	APP	21q21.3	2376,1
202325_s_at	NM_001685.1	ATP sintasa, complejo F0 mitocondrial transportador de H+, subunidad F6	ATPSJ	21q21.1	2303,1
214750_at	L13197	especifico de placenta 4	PLAC4	21q22.3	2209,9
222162_s_at	AK023795.1	motivo de tipo desintegrina a yADAMTS1 metaloproteasa (tipo reprotisina) con trombospondina tipo 1, 1	ADAMTS1	21q21.2	1780,8
217867_x_at	NM_012105.1	enzima que escinde APP en sitio beta 2	BACE2	q22.3 21	1093,4
221689_s_at	AB035745.1	Gen 5 de región crítica de síndrome de Down	DSCR5	21q22.2	900,7
209298_s_at	AF114488.1	1 intersectina (proteína de dominio SH3)	ITSN1	21q22.1- q22.2	199,9
#232191_at	BC005107.1	proteína hipotética BC005107	LOC90625	21q22.3	6910,2

\* Medianas de señales de micromatrices de cinco tejidos placentarios de primer trimestre

# Transcritos que se detectaron por matrices U133B de genoma humano (Affymetrix). Se detectaron transcritos sin especificación por matrices U133A de genoma humano (Affymetrix)

10 Identificación de SNP aplicables y determinación de frecuencias alélicas

[0097] Se identificaron SNP en las regiones transcritas de los loci genéticos del cromosoma 21 seleccionados con expresión en tejido placentario predominante de una base de datos pública. Las frecuencias alélicas de cada SNP se determinaron después en poblaciones tanto chinas como caucásicas. Se marcaron como objetivo SNP con altas tasas de heterocigosidad.

[0098] Entre los 13 genes del cromosoma 21 con expresión placentaria predominante (Tabla 1), se seleccionaron cuatro de los genes con los mayores niveles de expresión placentaria, concretamente *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)*, *superóxido dismutasa 1 (SOD1)*, *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)* y *subunidad O de ATP sintasa mitocondrial (ATP5O)*, para evaluación adicional. Los SNP que se localizan dentro de los exones de estos genes se seleccionaron para permitir el estudio de polimorfismos de ARNm. Las frecuencias alélicas de uno de estos polimorfismos codificantes se determinaron en 10 muestras de ADN de capa leucocítica chinas y 10 caucásicas por secuenciación directa con el uso de cebadores de PCR que flanquean los SNP correspondientes (Tabla 2). Se realizó secuenciación usando secuenciación de ciclo terminador BigDye v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un analizador de ADN modelo 3100 (Applied Biosystems)

**Tabla 2.** Cebadores de PCR para la secuenciación directa de los cuatro genes del cromosoma 21.

Transcrito	Secuencias (5' a 3')	
	Cebador directo	Cebador inverso
<b>COL6A1</b>	GGCTGACATCACCATCCTG TTGGAAGCCAGGACACAAC	AGAGCAGCAGCCTCTTCTTG TGAGGATTGGTGGGAAAAAC
<b>SOD1</b>	TTTTCCACTCCCAAGTCTGG TTGCAACACCAAGAAAAAGC	CGACAGAGCAAGACCCCTTTC TCTGGCAAATACAGGTCATTG

Transcrito	Secuencias (5' a 3')	
	Cebador directo	Cebador inverso
<b>COL6A2</b>	TCATCAACGTGGTCAACAGG GTGGACATCGTCTTCCTGCT AACGACAGTCTGCACGAGTC	TCACTCTCGTGCTTCTCGTG GTGGATGGCAGTGAGGTTGT CAGGTAGGTCAGGAGCCTTG
<b>ATP50</b>	GGCCTGAGATTCTTCACTGC	AAAATTAGCGGGACATGGTG

[0099] Las frecuencias alélicas de los SNP transcritos se muestran en la Tabla 3. Se consideró que los SNP que eran heterocigotos en al menos 30% de una de las dos poblaciones eran informativos y seleccionaron como dianas para desarrollo de ensayo adicional.

5

**Tabla 3.** Genotipación de los SNP codificantes en 10 individuos no relacionados chinos y 10 caucásicos para *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2* y *ATP50*.

<i>COL6A1</i>	alelo dbSNP	1053312 A/G	1053315 A/G	13879 T/C	1053320 T/C	1053331 A/G	9254 A/G
<i>Chino</i>	f (alelo menor)	0,20	0.20	0	0.20	0	0.10
	Heterocigosidad	0,32	0.32	0	0.320	0	0.18
<i>Caucásico</i>	f (alelo menor)	0,40	0.40	0.05	0.40	0.15	0.15
	Heterocigosidad	0,48	0.48	0.10	0.48	0.26	0.26
<i>SOD1</i>	alelo dbSNP	1804450 T/C	1804449 T/C	4804447 T/C	15012 G/A	1804448 G/T	
<i>Chino</i>	f (alelo menor)	0	0	0	0.20	0	
	Heterocigosidad	0	0	0	0.32	0	
<i>Caucásico</i>	f (alelo menor)	0	0	0	0.25	0	
	Heterocigosidad	0	0	0	0.38	0	
<i>COL6A2</i>	alelo dbSNP	1042917 A/G	2839114 A/G	3182348 T/C	1042930 A/G	6652 T/C	1043801 A/G
<i>Chino</i>	f (alelo menor)	0,50	0.50	0	0	0	0
	Heterocigosidad	0,50	0.50	0	0	0	0
<i>Caucásico</i>	f (alelo menor)	0,45	0.50	0	0	0.15	0.15
	Heterocigosidad	0,50	0.50	0	0	0.26	0.26
	alelo dbSNP	3087667 C/T	1043962 G/A	1043985 T/C			
<i>Chino</i>	f (alelo menor)	0	0	0			
	Heterocigosidad	0	0	0			
<i>Caucásico</i>	f (alelo menor)	0	0	0			
	Heterocigosidad	0	0	0			
<i>ATP50</i>	alelo dbSNP	4842 A/G	4591 C/T				
<i>Chino</i>	f (alelo menor)	0,15	0				
	Heterocigosidad	0,26	0				
<i>Caucásico</i>	f (alelo menor)	0,40	0				
	Heterocigosidad	0,48	0				

Se enumeran los números de referencia de dbSNP para cada locus de SNP. Para cada SNP, se enumera en primer lugar el alelo menor. "f (alelo menor)" indica la frecuencia del alelo menor.

Determinación de detectabilidad y especificidad de embarazo de transcritos seleccionados

10

[0100] Los cuatro transcritos del cromosoma 21 con expresión en placenta pueden detectarse en plasma materno usando ensayos de QRT-PCR en tiempo real desarrollados para amplificar las regiones no polimórficas de los cuatro transcritos. Estos transcritos están presentes en el plasma de mujeres embarazadas a concentraciones significativamente mayores en comparación con mujeres no embarazadas. Además, la concentración de los transcritos en el plasma materno desciende vertiginosamente después del nacimiento del niño. En consecuencia, la placenta es una fuente predominante de estos transcritos de ARNm en el plasma materno.

15

[0101] **Recogida y procesamiento de muestras.** Se recogieron muestras de sangre completa de seis mujeres no embarazadas y diez mujeres embarazadas de primer trimestre. También se reclutaron muestras de sangre periférica de cinco mujeres embarazadas de tercer trimestre antes y a las 24 horas después del parto. Se recogieron doce mililitros de las muestras de sangre en tubos de EDTA y se centrifugaron a 1600 x g durante 10 minutos a 4 °C. Después se transfirió cuidadosamente el plasma a tubos de polipropileno planos. Las muestras de plasma se

20

- volvieron a centrifugar a 16000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se recogieron en tubos de polipropileno nuevos. Se realizó extracción de ARN de plasma materno mezclando 3,2 ml de plasma con 4 ml de reactivo de Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0,8 ml de cloroformo (Ng, E. K. O. *et al.*, Clin Chem 48:1212-1217 (2002)). La mezcla se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C y la capa acuosa se transfirió a nuevos tubos. Se añadió un volumen de etanol 70% a un volumen de la capa acuosa. La mezcla se aplicó después a una mini columna RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) y se procesó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se eluyó ARN total con 60 µl de agua sin RNasa y se almacenó a -80 °C. Se llevó a cabo tratamiento con DNasa (equipo de DNasa sin RNasa, Qiagen, Hilden, Alemania) para eliminar cualquier ADN contaminante.
- 10 **[0102] Desarrollo de ensayos de QRT-PCR en tiempo real.** Se desarrollaron ensayos de QRT-PCR para la detección de ARNm de *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)*, *superóxido dismutasa 1 (SOD1)*, *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)* y *subunidad O de ATP sintasa mitocondrial (ATP5O)*. Las secuencias de los cebadores y las sondas fluorescentes de unión al surco menor (MGB) TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) se muestran en la Tabla 4. Se prepararon curvas de calibración por diluciones en serie de oligonucleótidos de ADN sintético monocatenarios purificados por cromatografía líquida de alto rendimiento (Bustin, 2000) (Prologo, Singapur)
- 15 específicos para los amplicones respectivos, con concentraciones que variaban de 1 X 10<sup>6</sup> copias a 10 copias. Las secuencias del oligonucleótido de ADN sintético para *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2* y *ATP5O* se describen en la Tabla 4. Las concentraciones absolutas de todos los transcritos se expresaron como copias/ml de plasma.



Tabla 4. Secuencias de cebadores y sondas para detección por QRT-PCR en tiempo real de los transcritos expresados en placenta codificados en el cromosoma 2<sup>1</sup>

Transcritos		Secuencias (5' a 3') <sup>1</sup>
<b>COL6A1</b>	Cebador D	GACAAAGTCAAGTCCCTCACCAA
	Cebador I	GCGTCCACACCAGGTTT
	Sonda	(FAM)CGCTTCATCGACAACC (MGBNFQ)
	curva patrón	TGGACAAAAGTCAAAGTCCCTCACCAAAGCGCTTCATCGACAACCCTGAGGGACAGGTACTACCG CTGTGACCCGAAACCCTGGTGTGGAAACGCAG
<b>SOD1</b>	Cebador D	CAGGGCATCATCAATTTCG
	Cebador I	TGCTTCCCACACCCTTCA
	Sonda	(FAM)CAGAAGGAAAGTAATGGACCA(MGBNFQ)
	curva patrón	TGCAGGGCATCATCAATTTCGAGCAGAAGGAAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAG CATT
<b>COL6A2</b>	Cebador D	GATCAACCAGGACACCATCAA
	Cebador I	CCGTAGGCTTCGTGTTTCA
	Sonda	(FAM)CGCATCATCAAGGTC(MGBNFQ)
	curva patrón	GAGATCAACCAGGACACCATCAACCCGATCATCAAGGTCATGAAACACCGAAGCCTACGGAG
<b>ATP50</b>	Cebador D	CCCTCACTACCAACCTGATCA
	Cebador I	CCTTGGGTATTGCTTAATCGA
	Sonda	(FAM)TGCTTGCTGAAAAATG(MGBNFQ)
	curva patrón	TCCCCTCCTACCCTGATTTTGCCTTGCTGAAAAATGGTCGATTAAGCAATACCCCAAGGAG

<sup>1</sup>FAM: Marcador fluorescente; MGBNFQ: interruptor no fluorescente de unión al surco menor.

**[0103]** Las reacciones de QRT-PCR se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante (equipo de reactivo de PCR de ARN r*Tth*, Applied Biosystems) en un volumen de reacción de 25 µl. Los ensayos de QRT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador y detector fluorescente combinados (ABI Prism 7700, Applied Biosystems).

5 Para los cuatro transcritos, los cebadores de PCR (Proligo) y las sondas fluorescentes (Applied Biosystems) se usaron a concentraciones de 300 nM y 100 nM, respectivamente. Se usaron 5 µl de ARN de plasma extraído para amplificaciones. Se incluyeron múltiples blancos de agua negativos en cada análisis.

**[0104]** Los perfiles térmicos usados para análisis de *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2* y *ATP5O* fueron los siguientes: la  
10 reacción se inició a 50 °C durante 2 minutos para que actúe la uracil N-glicosilasa incluida, seguido de transcripción inversa a 60 °C durante 30 minutos. Después de una desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, se llevaron a cabo 40 ciclos de PCR usando desnaturalización a 92 °C durante 15 segundos y 1 minuto de hibridación/extensión a 57 °C para *COL6A1* y *ATP5O*, 56 °C para *COL6A2* y 59 °C para *SOD1*.

15 **[0105] Pueden detectarse transcritos del cromosoma 21 expresados en placenta en plasma materno y son específicos de embarazo.** La mediana de las concentraciones de ARNm en plasma en mujeres no embarazadas, embarazo de primer trimestre y de tercer trimestre fueron 0 copias/ml, 0 copias/ml y 72,6 copias/ml, respectivamente, para *COL6A1* (Figura 2A); 25,3 copias/ml, 53,0 copias/ml y 155,6 copias/ml para *SOD1* (Figura 2B); 0,8 copias/ml, 2,1 copias/ml y 8,8 copias/ml para *COL6A2*, (Figura 2C); 6,2 copias/ml, 88,2 copias/ml y 126,4  
20 copias/ml para *ATP5O* (Figura 2D). Para los cuatro transcritos, sus concentraciones en plasma en el tercer trimestre de embarazo fueron significativamente mayores que las del grupo de no embarazadas (ensayo de suma de rangos Mann-Whitney,  $P < 0,05$  para ARNm de *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2* y *ATP5O*). Además, en las muestras de plasma antes del parto, la mediana de las concentraciones de ARNm de *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2* y *ATP5O* fueron 72,6 copias/ml, 155,6 copias/ml, 8,8 copias/ml y 126,4 copias/ml, respectivamente (Figura 3A para ARNm de *COL6A1*,  
25 Figura 3B para ARNm de *SOD1*, Figura 3C para ARNm de *COL6A2* y Figura 3D para ARNm de *ATP5O*). A su vez en las muestras de plasma post-parto, la mediana de concentraciones de ARNm de *COL6A1*, *SOD1*, *COL6A2* y *ATP5O* fueron 0 copias/ml, 56,2 copias/ml, 0,8 copias/ml y 56,2 copias/ml, respectivamente.

**Ejemplo 2: detección de trisomía del 21 en el feto de una mujer embarazada por rt-pcr cuantitativa en tiempo  
30 real**

**[0106]** Los dos SNP con las mayores tasas polimórficas se seleccionaron como dianas para desarrollo de QRT-PCR específico de alelos. Se diseñaron sondas de hibridación diferenciadoras para permitir la diferenciación de los diferentes alelos de cada SNP. Se obtuvieron resultados de genotipación idénticos tanto por la PCR en tiempo real  
35 como por la secuenciación directa que confirmaron la especificidad de alelo de las sondas. Las sondas se incorporaron después en el ensayo de QRT-PCR en los que los niveles de expresión relativa de los diferentes alelos de cada SNP en tejidos placentarios se midió en primer lugar. Se ensayó ARN extraído de CVS normal y placentas a término normales, así como de placentas de embarazos con trisomía del 21 por la QRT-PCR específica de alelos. Las relaciones de los alelos de cada SNP en los embarazos con y sin trisomía del 21 son sustancialmente  
40 diferentes, permitiendo la detección de trisomía del 21 en el feto usando el plasma de la madre.

**[0107] Recogida y procesamiento de muestras.** Se obtuvieron muestras de tejido placentario de 13 embarazos de primer trimestre y 20 de tercer trimestre de mujeres embarazadas por muestra de la vellosidad del corion (CVS) antes de terminaciones terapéuticas o inmediatamente después de parto por cesárea optativo, respectivamente.  
45 También se reclutaron tejidos placentarios de siete embarazos con trisomía del 21. Todos los tejidos se procesaron como se ha descrito anteriormente

**[0108] Desarrollo de QRT-PCR en tiempo real específica de alelos.** Se seleccionaron los dos SNP codificantes informativos con las mayores tasas polimórficas, rs1053312 (números de referencia de dbSNP) y rs2839114 de los genes *COL6A1* y *COL6A2*, respectivamente. Se establecieron ensayos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real  
50 específicos de alelo para medir las concentraciones relativas de los dos alelos de cada SNP. Para permitir la diferenciación alélica, se incluyeron dos sondas MGB fluorogénicas, cada una específica de un alelo, en cada ensayo de QRT-PCR. Las dos sondas se marcaron con colorantes indicadores fluorescentes FAM (6-carboxifluoresceína) y VIC. Las secuencias de los cebadores y sondas de los sistemas de QRT-PCR específicos de  
55 alelos se muestran en la Tabla 5. Se obtuvieron resultados de genotipación idénticos tanto por la PCR en tiempo real como por secuenciación directa que confirmaron la especificidad de alelos de las sondas.

**Tabla 5.** Secuencias de cebadores y sondas para detección por QRT-PCR en tiempo real específica de alelos de los ARN-SNP diana.

Transcritos	dbSNP		Secuencias (5' a 3') <sup>1</sup>
<b>COL6A1</b>	1053312	Cebador D	GGCAGCCACAACCTTTGACAC
		Cebador I	CTCGGCCAGGCGCTT
		Sonda (alelo G)	(VIC) ACCAAGCGCTTCGC (MGBNFQ)
		Sonda (alelo A)	(FAM) ACCAAGCACTTCGC (MGBNFQ)

Transcritos	dbSNP		Secuencias (5' a 3') <sup>1</sup>
<b>COL6A2</b>	2839114	Cebador D	GGCGCCAGAAGACACGT
		Cebador I	GTCGTGGCGCCCGT
		Sonda (alelo G)	TGATGACCACCGCAAA(MGBNFQ) (VIC)
		Sonda (alelo A)	(FAM) TGATGACTACCGCAAA (MGBNFQ)

<sup>1</sup> VIC y FAM: marcadores fluorescentes; MGBNFQ: interruptor no fluorescente de unión al surco menor

**[0109]** Las reacciones de QRT-PCR para diferenciación de alelos y cuantificación relativa se prepararon de acuerdo con el procedimiento expuesto anteriormente usando los cebadores de PCR (Proligo) y las sondas de MGB (Applied Biosystems) a concentraciones de 450 nM y 100 nM, respectivamente, y 17 ng de muestras de ARN placentario para amplificaciones. Cada QRT-PCR se realizó por duplicado en un detector de secuencias Applied Biosystems 7700. El perfil térmico usado fue el descrito anteriormente usando una temperatura de 59 °C para la etapa de hibridación/extensión. Se incluyeron solamente muestras heterocigotas en el análisis.

**[0110]** *Análisis estadístico.* Se realizó análisis estadístico usando el software Sigma Stat 2.03 (SPSS).

**[0111]** *Cuantificación relativa de ARN-SNP codificados en el cromosoma 21.* Las cantidades relativas de los dos alelos se determinan por la diferencia de sus valores de ciclo umbral ( $\Delta Ct$ ) o por la diferencia de sus intensidades de fluorescencia acumuladas ( $\Delta \Delta Rn$ ), como se calcula por las siguientes ecuaciones:

$$\Delta Ct = Ct_{FAM} - Ct_{VIC}$$

$$\Delta \Delta Rn = \Delta Rn_{FAM} - \Delta Rn_{VIC}$$

en las que  $Ct_{FAM}$  y  $Ct_{VIC}$  son los valores de ciclo umbral del alelo A (como se detectó por una sonda marcada con FAM) y alelo B (como se detectó por una sonda marcada con VIC).  $\Delta Rn_{FAM}$  y  $\Delta Rn_{VIC}$  son las intensidades de fluorescencia acumuladas del alelo A y alelo B, como se calculó por el software SDS v1.9 (Applied Biosystems). Los valores de Ct y  $\Delta Rn$  están relacionados logarítmicamente con la abundancia de productos de PCR, por lo tanto la diferencia de los valores de Ct y  $\Delta Rn$  para cada ARN-SNP (los valores de  $\Delta Ct$  y  $\Delta \Delta Rn$ ) refleja la relación de ARN-SNP entre los dos alelos de ARN.

**[0112]** Para el SNP rs1053312 (*COL6A1*), una CVS, seis placentas a término de embarazos normales y tres muestras de placenta con trisomía del 21 fueron heterocigotas para el sitio polimórfico, como se determinó por la QRT-PCR específica de alelos. En la Figura 4, los valores de  $\Delta Ct$  para las tres placentas con trisomía del 21 se desviaron de los valores de  $\Delta Ct$  de CVS y tejidos placentarios a término obtenidos de embarazos normales.

**[0113]** Para el SNP rs2839114 (*COL6A2*), ocho CVS y trece placentas a término de embarazos normales, así como tres placentas con trisomía de 21 fueron heterocigotas para el locus de SNP como se genotipó por el ensayo de QRT-PCR específico de alelos. Como se muestra en la Figura 5A, los valores de  $\Delta Ct$  de las tres placentas con trisomía del 21 se desviaron de los de los embarazos normales, mostrando dos casos de trisomía del 21 valores de  $\Delta Ct$  mayores y el caso restante con un valor reducido. Las desviaciones de los valores de  $\Delta Ct$  de placentas con trisomía del 21 pueden quedar por encima o por debajo del intervalo de embarazo normal, dependiendo de qué alelo esté sobrerrepresentado. Se obtuvieron resultados similares usando los valores de  $\Delta \Delta Rn$  (Figura 5B).

### **Ejemplo 3: detección de trisomía del 21 en el feto de una mujer embarazada por extensión de cebadores y detección de espectrometría de masas**

**[0114]** Los dos SNP con las mayores tasas polimórficas (rs1053320 en *COL6A1* y rs2839114 en *COL6A2*) se marcaron como objetivos para desarrollo de ensayos adicional. Los ensayos de reacción de extensión de cebadores permitieron la determinación del genotipo de SNP de las muestras de tejido placentario. Las muestras se procesaron usando una espectrometría de masas para diferenciar los diferentes alelos de ARN-SNP, y determinar los niveles de expresión relativos de los alelos de ARN-SNP para calcular la relación de los alelos. La diferencia en las relaciones de los alelos de cada SNP para embarazos con y sin trisomía del 21 es suficientemente grande para que la detección de la trisomía del 21 en el feto sea posible usando el plasma de la madre.

**[0115]** *Recogida y procesamiento de tejido placentario.* Se obtuvieron muestras de tejido placentario de segundo trimestre de mujeres embarazadas que portaban fetos con trisomía del 21 antes de terminaciones terapéuticas. Se recogieron muestras de tejido placentario del tercer trimestre de fetos cariotípicamente normales inmediatamente después del parto. Las muestras de tejido placentario se dividieron en dos partes, una de las cuales se almacenó en RNeasy (Qiagen, Crawley, Reino Unido) inmediatamente después de la recogida y se mantuvo a -80 °C hasta la extracción de ARN, mientras que la otra parte se mantuvo inmediatamente a -80 °C hasta extracción de ADN. El ADN se extrajo de los tejidos placentarios usando el mini kit QIAamp usando el protocolo tisular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). Se extrajo ARN total de tejidos placentarios con el

reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificó con mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo los protocolos del fabricante.

**[0116] Amplificación de ADN y ARN placentarios.** Para la amplificación de ARN, se transcribieron de forma inversa 450 ng de ARN placentario con hexámeros aleatorios (ThermoScript, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 25 ng de ADN o ADNc correspondientes a 50 ng de ARN total para cada reacción de PCR (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems). Las secuencias de cebadores para la amplificación de cada uno de los locus de SNP en *COL6A1* y *COL6A2* se muestran en la Tabla 6. Se usaron cebadores de PCR a concentraciones finales de 200 nM para un volumen de PCR de 25 µl. Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 10 minutos, seguido de desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto durante 45 ciclos, y finalmente incubación a 72 °C durante 3 minutos.

**Tabla 6.** Secuencias de cebadores para la amplificación de los loci de SNP en *COL6A1* y *COL6A2*.

Transcritos	SNP		Secuencias (5' a 3')
<i>COL6A1</i>	rs1053320	Cebador D	ACGTTGGATGCTATGTGACCCGCTTCTACC
		Cebador I	ACGTTGGATGGAGTTGCCATCTGAGAAGAG
<i>COL6A2</i>	rs2839114	Cebador D	ACGTTGGATGACCGCCTCATCAAGGAGAGC
		Cebador D	ACGTTGGATGAAGTTGAGGTCATCGTCCCG

15

**[0117] Detección de SNP por reacción de extensión de cebadores.** Se diseñaron ensayos de reacción de extensión de cebadores para determinar el genotipo de SNP de las muestras de tejido placentario. Los genotipos de ARN-SNP placentarios se compararon con los obtenidos para ADN placentario. Los productos de PCR de ADN y ARN placentario se trataron con fosfatasa alcalina de camarón (Sequenom, San Diego, Estados Unidos) durante 40 minutos a 37 °C seguido de 5 minutos a 85 °C para retirar exceso dNTP. Se añadió un cebador de extensión de cebadores y una mezcla de 2',3'-didesoxinucleósido trifosfatos (ddNTP) y dNTP a los productos de PCR tratados. Se usaron secuencias para el cebador de extensión de cebadores diseñadas para explorar el SNP seleccionado en *COL6A1* y *COL6A2* en la Tabla 7. Se usó una thermoSequenase (Sequenom) para las reacciones de extensión de bases usando protocolo de ensayo MassARRAY™ Homogeneous MassEXTEND™ (hME) convencional de Sequenom. Las condiciones de extensión de bases fueron: 94 °C durante 2 minutos, seguido de 94 °C durante 5 segundos, 52 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 5 segundos durante 75 ciclos. Se muestran secuencias de los productos con cebadores extendidos para cada alelo de SNP en la Tabla 7. Los productos de extensión finales se trataron con resina SpectroCLEAN (Sequenom) para eliminar sales en el tampón de reacción. Se distribuyeron aproximadamente 10 nl de solución de reacción en una SpectroCHIP de formato 384 (Sequenom) usando un nanodispensador SpectroPoint (Sequenom). Se usó un espectrómetro de masas MALDI-TOF compacto (Bruker) para adquisiciones de datos. Los pesos moleculares esperados de todos los picos relevantes se calculan antes del análisis (Tabla 7) y se identifican a partir del espectro de masas. El genotipo de SNP se determina puntuando la presencia o ausencia de las señales de masa correspondientes a un alelo de SNP particular.

**Tabla 7.** Secuencias de los cebadores de extensión de cebadores y secuencias esperadas y masas moleculares de los productos extendidos para los alelos de SNP respectivos para rs1053320 en *COL6A1* y rs2839114 en *COL6A2*.

Transcritos	SNP		Secuencias extendidas <sup>†</sup>	Masa (Da)
<i>COL6A1</i>	rs1053320	No extendido	CTCTTCTTGGCAGCGCC	5113,3
		alelo T	CTCTTCTTGGCAGCGCCA	5410,5
		alelo C	CTCTTCTTGGCAGCGCCGGA	6068,9
<i>COL6A2</i>	rs2839114	No extendido	AAGACACGTGTGTTTGCGGT	6188,0
		alelo A	AAGACACGTGTGTTTGCGGTA	6485,2
		alelo G	AAGACACGTGTGTTTGCGGTGGT	7134,6

<sup>†</sup> Las fuentes en negrita indican los dNTP y ddNTP extendidos.

**[0118] Determinación de relación de SNP.** Los datos espectrométricos de masas se importaron automáticamente en la base de datos SpectroTYPER (Sequenom) para el análisis automático. Se determinó la relación de la frecuencia de picos de las señales de masa para los dos alelos de SNP en fetos heterocigotos para el SNP explorado. Se comparó la relación de SNP obtenida para fetos cariotípicamente normales y con trisomía del 21. La relación de SNP de ADN placentario de los fetos con trisomía del 21 se desvió de la obtenida para los fetos normales para los SNP tanto en *COL6A1* (Figura 6A) como en *COL6A2* (Figura 7A). La relación de SNP para los fetos con trisomía del 21 se reduciría o aumentaría en comparación con la de los fetos normales dependiendo del genotipo de SNP del cromosoma 21 trisómico. También se mostró que la relación de SNP de tejido placentario de los SNP explorados en transcritos de ARN de *COL6A1* (Figura 6B) y *COL6A2* (Figura 7B) para los fetos con trisomía del 21 se desvía de la obtenida para fetos normales.

**Ejemplo 4: detección prenatal no invasiva de fetos con trisomía del 21 usando arn fetal en circulación en plasma materno por extensión de cebadores y espectrometría de masas**

[0119] Para demostrar que los SNP adicionales también son útiles para la detección de trastornos cromosómicos en el feto de una mujer embarazada, se investigó *específico de placenta 4 (PLAC4)* (Tabla 19). Los ensayos de reacción de extensión de cebadores permitieron la determinación del genotipo de ARN-SNP del tejido placentario y muestras de plasma materno. Los productos de extensión de cebadores se analizaron usando espectrometría de masas para cuantificar la relación de alelos de ARN-SNP. La diferencia de las relaciones de los alelos de un SNP de *PLAC4* para embarazos con y sin trisomía del 21 es suficientemente grande para que sea posible la detección de trisomía del 21 del feto usando el plasma de la madre.

Identificación de SNP codificantes aplicables en gen específico de placenta 4 (PLAC4) y determinación de frecuencias alélicas

[0120] **Identificación de SNP.** El gen *específico de placenta 4 (PLAC4)* se expresa en gran medida en la placenta, pero se expresa a niveles bajos en las células de la capa leucocítica. El gen *PLAC4* se localiza en la región crítica del síndrome de Down del cromosoma 21. La secuencia del gen *PLAC4* se enumera en la Tabla 19 y abarca las coordenadas de nucleótidos 41469028-41480585 en el cromosoma 21 basándose en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el buscador de genoma de UCSC (genome.ucsc.edu). La secuencia del gen *PLAC4* como se enumera en la Tabla 19 consiste en todas las variantes de corte y empalme de ARN de *PLAC4* conocidas y predichas identificadas por los números de referencia de GenBank: AF269287, AK027868, AK092431, BC093685, BC101615, BC101617, L13197, NM\_182832 y LOC191585. Se identificaron SNP polimórficos por secuenciación de las regiones exónicas/transcritas del gen *PLAC4*. Se analizó secuenciación directa en muestras de ADN placentario de 10 mujeres embarazadas chinas no relacionadas. Se amplificaron en primer lugar veinte nanogramos de ADN genómico por PCR. Se realizó secuenciación usando secuenciación de ciclo terminador BigDye v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un analizador de ADN modelo 3100 (Applied Biosystems).

[0121] **Determinación de la frecuencia alélica.** Se descubrió que cuatro SNP codificantes en la región transcrita de *PLAC4* eran polimórficos en la población china (Tabla 8). Estos cuatro SNP se localizan en las posiciones de nucleótidos del cromosoma 21 41470591, 41471145, 41476236 y 41478755, respectivamente, de la secuencia del cromosoma 21 del ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el buscador de genoma de UCSC (genome.ucsc.edu). Los números de acceso de dbSNP para los SNP hallados en las posiciones de nucleótidos del cromosoma 21 41470591 y 41478755 son rs9977003 y rs8130833, respectivamente. Los dos SNP restantes fueron nuevos que se nombran en la presente memoria *PLAC4-41471145* y *PLAC4-41476236*, de acuerdo con sus coordenadas de nucleótidos en el cromosoma 21 en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el buscador de genoma de UCSC (genome.ucsc.edu). Sus frecuencias alélicas se muestran en la Tabla 9. rs8130833 fue el SNP más polimórfico entre los cuatro SNP y se seleccionó para desarrollo de ensayos adicional.

**Tabla 8.** Cuatro SNP polimórficos localizados en la región codificante de *PLAC4*.

SNP	Secuencia
<i>PLAC4</i> -41478755 <sup>1</sup> (rs8130833) <sup>2</sup>	5' - TTTTACAAAATAAGCCTAATCGTAAAATATCACTATAGTATATAGAACCATGTTTAGGCC AGATATATTCGTC [A/G] TCTAACTTGTATTTAACCCAAATGGTGTGCAATACAAAATGAGT TTCTTTTTCTTTAAGCCAAATTTGAATTTGCTCCAATAGCTTAAAAGACACCCTAGCGCG - 3'
<i>PLAC4</i> -41471145 <sup>1</sup>	5' - CTCACATCTCTAAAGGCCACTCAGGTGGGACACCATCAAGACATTGAAAATCGACAGAAG GAAGGCAGGAAGGGGAGAGGATC [A/G] AACCTGTCAAATAGATATTCAGAAAATCTGTGCT CTAAAATAAGGCAGCCCTTCCCTCACAGCACACTTATTCTAATTTCAACAGGACTCCTAG - 3'
<i>PLAC4</i> -41470591 <sup>1</sup> (rs9977003) <sup>2</sup>	5' - TCATTCTGAGGCGGTGCTGCTGAAAATCTTGGTGTGAACTGTGTTTTGAGATTTCCA GTCTATCAC [A/G] GGGCCACAAGGTGTAATATCAAGAAAATGAATTACTAGAAAGGCAAAG TGAAAAGACATACAAAATACAAGTGTCATTCTTTTATTCTTAGTTGGACAGATAGTC - 3'
<i>PLAC4</i> -41476236 <sup>1</sup>	5' - TAATTGATTCTTGGGGTATCCCTGTCTTTACCCTGTCTTTAAGGTTTTAGCAAGACTAAG TCTCCTGGTTGAAC [C/T] GGGGAGCTATTTTTCTTTGTGGGAAGGACAGTATTTTATTTT TATATTGGAGGGCCTTTTGAACCTGTCTCAAATTCTAAAGGGGAGGGGGGAAGTTTCATA - 3'

El ARNm de *PLAC4* se transcribió en la dirección inversa de las secuencias mostradas en la tabla.

<sup>1</sup> El número marca la localización del SNP basándose en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el buscador de genoma de UCSC (genome.ucsc.edu/).

<sup>2</sup> Numero de referencia dbSNP

40

**Tabla 9.** Frecuencias alélicas de cuatro SNP que codifican *PLAC4* en muestras de ADN placentarias de 10 mujeres embarazadas chinas no relacionadas.

SNP	rs8130833	<i>PLAC4</i> - 41471145	rs9977003	<i>PLAC4</i> -41476236
Alelo	G/A	A/G	A/G	TC
f (alelo menor)	0,25	0,10	0,10	0,10
Heterocigosidad	0,38	0,18	0,18	0,18

Para cada SNP, se enumera en primer lugar el alelo menor. "f (alelo menor)" indica la frecuencia del alelo menor.

Determinación de relaciones alélicas de ARN de *PLAC4* en plasma materno usando un marcador de S-NP

**[0122] Recogida y procesamiento de muestras.** Se obtuvieron muestras tisulares placentarias de primer y segundo trimestre de siete mujeres embarazadas que portaban fetos con trisomía del 21. También se recogieron tejidos placentarios de 26 mujeres embarazadas que portaban fetos cariotípicamente normales por toma de muestras de vellosidad del corion (CVS). Las muestras placentarias se almacenaron en RNAlater™ (Ambion®, Austin, TX) inmediatamente después de su recogida y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ARN. Se recogieron muestras de sangre periférica de 43 mujeres embarazadas que portaban un único feto euploide y cinco mujeres embarazadas que portaban un único feto con trisomía del 21 durante su primer trimestre de embarazo. Se recogieron muestras de plasma como se ha descrito en el Ejemplo 1.

**[0123]** Se extrajo ARN total de los tejidos placentarios con Trizol (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Se extrajo ARN de 1,6 a 3,2 ml de las muestras de plasma maternas. Para cada mililitro de plasma, se añadieron 3 ml de reactivo Trizol LS y 0,8 ml de cloroformo. La mezcla se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, se recogió la capa acuosa. Se añadieron quinientos treinta y ocho microlitros de etanol absoluto por cada 1 ml de capa acuosa. La mezcla se aplicó a las mini columnas de RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) y se procesó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se eluyó ARN total con 48 µl de agua sin RNasa para cada columna. El ARN eluido final de las dos columnas se agrupó. Después se llevó a cabo tratamiento con DNasa para eliminar cualquier ADN contaminante (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

**[0124] Amplificación por PCR y transcripción inversa.** Se transcribieron de forma inversa 1,25 microgramos de ARN placentario o 48 µl de ARN de plasma en un volumen de reacción de 40 µl o 100 µl, respectivamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoScript, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), usando promotores específicos de genes (las secuencias se muestran en la Tabla 10).

**[0125]** Para cada reacción de amplificación por PCR, se usaron 40 µl del ADNc placentario o 100 µl del ADNc de plasma materno en un volumen total 80 µl o 200 µl, respectivamente. Cada reacción contenía tampón de PCR *Taq* HotStar 0,6X con MgCl<sub>2</sub> 0,9 mM (Qiagen), 25 µM de cada uno de dATP, dGTP y dCTP, 50 µM de dUTP (Applied Biosystems), 200 nM de cada uno de cebadores directo e inverso (Integrated DNA Technologies) y 0,02 U/µl de *Taq* Polimerasa HotStar (Qiagen). Las secuencias de cebadores de PCR se muestran en la Tabla 10. La reacción de PCR se inició a 95 °C durante 7 minutos, seguido de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 56 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1 minuto durante 55 ciclos, y una incubación final a 72 °C durante 3 minutos.

**Tabla 10.** Secuencias de cebadores para amplificación por PCR y transcripción inversa de la secuencia que contiene SNP rs8130833.

Cebador	Secuencia (5' a 3')
Cebador específico de gen para transcripción inversa	GTATATAGAACCATGTTTAGGCCAG
Cebador de PCR directo	ACGTTGGATGGTATTGCAACACCATTGGG
Cebador de PCR inverso	ACGTTGGATGTAGAACCATGTTTAGGCCAG

**[0126] Detección de SNP y cuantificación de relación alélica por reacción de extensión de cebadores.** La reacción de extensión de cebadores se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 3. El producto de PCR se trató en primer lugar con fosfatasa alcalina de camarón (Sequenom, San Diego, Estados Unidos). Se mezclaron cuatro microlitros de cóctel de extensión de bases que contenía cebador de extensión 771 nM (Integrated DNA Technologies), 1,15 U de Thermosequenase (Sequenom) y 64 µM de cada uno de ddATP, ddCTP, ddTTP y dGTP (Sequenom, San Diego, Estados Unidos) con 5 µl de agua y 5 µl del producto de PCR. El perfil térmico fue de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 94 °C durante 5 segundos, 52 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 5 segundos durante 100 ciclos. Las secuencias y pesos moleculares para el cebador de extensión y los productos de extensión para cada alelo de SNP se muestran en la Tabla 11. Los pesos moleculares de los productos de extensión finales se determinaron por espectrometría de masas MALDI-TOF como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se determinaron las relaciones de las áreas de pico para los productos de extensión de cebadores que representan los dos alelos de SNP en fetos heterocigotos para el SNP.

**Tabla 11.** Secuencias y pesos moleculares del cebador de extensión y los productos de extensión esperados para SNP rs8130833.

	Secuencia	Peso molecular (Da)
Cebador no extendido	AGGCCAGATATATTCGTC	5498,6
Producto de extensión para el alelo A	AGGCCAGATATATTCGTC <b>A</b>	5795,8
Producto de extensión para el alelo G	AGGCCAGATATATTCGTC <b>G</b>	6116,0

Las letras en negrita indican los restos de dNTP y ddNTP añadidos al cebador de extensión

Desarrollo de ensayo de QRT-PCR en tiempo real

**[0127]** Se desarrolló un ensayo de QRT-PCR para ARNm de *PLAC4* para evaluar si hay diferencias cuantitativas en las concentraciones de ARNm de *PLAC4* en el plasma materno entre embarazos con trisomía del 21 y normales.

5 Las secuencias de los cebadores (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), sondas fluorescentes de unión al surco menor (MGB) TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) y el calibrador (Prologo, Singapur) se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Secuencias de los cebadores de PCR, la sonda y el calibrador para detección por QRT-PCR en tiempo real de ARNm de *PLAC4*.

Cebador	Secuencia (5' a 3')
Cebador D	CCTTTCCCCTTATCCAAC
Cebador I	GTAAGGTTGGGCTCATTCT
Sonda	(FAM) CCCTAGCCTATACCC (MGBNFQ)
Calibrador	<b>CACCTTTCCCCTTATCCAACCTAGCCCTAGCCTATACCCTCTGCTGCCCA AGAAAATGAGCCCAACCAGTACAC</b>

MGBNFQ: interruptor no fluorescente de unión a surco menor

**[0128]** Las reacciones de QRT-PCR se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante (equipo de reactivo de PCR de ARN EZ *rTth*, Applied Biosystems) en un volumen de reacción de 25 µl. Los ensayos de QRT-PCR se llevaron a cabo en un ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Los cebadores de PCR y la sonda fluorescente se usaron a concentraciones de 400 nM y 100 nM, respectivamente. Se usaron 5 µl de ARN extraído para amplificación. El perfil de termociclación fue: la reacción se inició a 50 °C durante 2 minutos, seguido de transcripción inversa a 60 °C durante 30 minutos. Después de una desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, se llevaron a cabo 45 ciclos de PCR usando desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y 1 minuto a 60 °C.

20 DetECCIÓN DE DIFERENCIA EN LA RELACIÓN ALÉLICA DE ARN DE *PLAC4* EN PLACENTAS Y MUESTRAS DE PLASMA MATERNO DE MUJERES EMBARAZADAS CON FETOS NORMALES Y CON TRISOMÍA DEL 21

**[0129]** Las relaciones alélicas de transcritos de ARN en las placentas de embarazos cariotípicamente normales y con trisomía del 21 se compararon usando el SNP rs8130833. Las relaciones se calcularon dividiendo la cantidad relativa de alelo G (alelo de mayor masa, es decir, el alelo por el que el producto de extensión demuestra una mayor masa en los espectros de masas) con la cantidad relativa de alelo A (alelo de menor masa, es decir, el alelo por el que el producto de extensión demuestra una masa menor en los espectros de masas). Como se muestra en la Figura 8, todas las muestras de trisomía del 21 mostraron relaciones alélicas bien distinguibles de las muestras normales. Las relaciones alélicas de las muestras de trisomía del 21 se separaron en dos grupos. Las muestras de trisomía con un alelo G extra mostraron una relación alélica mayor que el intervalo normal, mientras que las muestras con un alelo extra A mostraron una relación de alelos menor que el intervalo normal.

**[0130]** Las relaciones alélicas de ARNm de *PLAC4* también se compararon en plasma materno de mujeres que portaban fetos cariotípicamente normales y con trisomía del 21 usando el SNP rs8130833. Todas excepto una de las muestras con trisomía demostraron relaciones alélicas que se desviaban de las muestras normales (Figura 9). Los datos muestran que puede detectarse aneuploidía fetal de forma no invasiva analizando las relaciones alélicas de transcritos específicos fetales en circulación en plasma materno usando marcadores polimórficos tales como SNP.

40 **[0131]** Se descubrió una correlación positiva para la relación alélica del SNP rs8130833 entre el ARN de *PLAC4* placentario y el ARN *PLAC4* en circulación en el plasma materno (Figura 10) (correlación de Pearson,  $P < 0,05$ ). Este hallazgo proporciona pruebas adicionales de que la placenta es una fuente principal para liberar ARNm de *PLAC4* en el plasma materno.

45 Comparación de ARNm de *PLAC4* en circulación en embarazos euploides y con trisomía del 21

**[0132]** Se compararon las concentraciones de ARNm de *PLAC4* en circulación entre embarazos cariotípicamente normales y con trisomía del 21. Se recogieron muestras de plasma de 29 mujeres embarazadas que portaban fetos euploides y 5 mujeres embarazadas que portaban fetos con trisomía del 21 durante el primer y segundo trimestre de embarazo. Las muestras de plasma se midieron para concentraciones de ARNm de *PLAC4* por RT-PCR de una etapa en tiempo real como se ha descrito. Como se muestra en la Figura 11, se detectó ARNm de *PLAC4* en todas las muestras de plasma trisómicas. Las medianas para los embarazos con trisomía del 21 y normales son 5581 copias/ml y 4836 copias/ml respectivamente. No se establecieron diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de ARNm de *PLAC4* en plasma entre los embarazos normales y con trisomía del 21. Esto demuestra que la mera cuantificación de ARNm de *PLAC4* en plasma materno no proporciona una evaluación fiable de la presencia de trisomía del 21 fetal.

**Ejemplo 5: detección de fetos con trisomía del 18 usando arn expresado en fetos en placentas por extensión de cebadores y espectrometría de masas**

[0133] Para demostrar que pueden detectarse trastornos cromosómicos adicionales usando otros genes, se investigó el *inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) miembro 2 (SERPINB2)* (número de referencia de GenBank: NM\_002575) con respecto a la capacidad para detectar trisomía del 18. Los ensayos de reacción de extensión de cebadores permitieron la determinación del genotipo de SNP de las muestras tisulares placentarias. Las muestras se procesaron usando espectrometría de masas para diferenciar los diferentes alelos de ARN-SNP, y determinar los niveles de expresión relativos de los alelos de ARN-SNP para calcular la relación de los alelos. La diferencia de las relaciones de los alelos de un SNP de *SERPINB2* para embarazos con y sin trisomía del 18 es suficientemente grande para que la detección de trisomía del 18 en el feto sea posible usando muestras de ARN placentario.

**Determinación de la relación alélica de ARNm de inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) miembro 2 en placentas**

[0134] Se seleccionó el *inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) miembro 2 (SERPINB2)* expresado en placenta. El gen *SERPINB2* se localiza en el cromosoma 18. Se identificó un SNP polimórfico (Tabla 13) localizado dentro de la región codificante del gen *SERPINB2* a partir de una base de datos pública y se seleccionó para desarrollo de ensayos.

**Tabla 13.** Un SNP polimórfico dentro de la región codificante del gen de *SERPINB2*

SNP	Secuencia
SERPINB2 (rs6098) <sup>1</sup>	5' - GTTCTGTGTTATATATAAAGAATTCCTTCTTTCTTTTCAAGGCACAAGCTGCAGATAAAATCC ATTCATCCTCCGCTCTCTCAGCTCTGCAATCAATGCATCCACAGGG [A/G] ATTATTTACTGGAA AGTGCAATAAGCTGTTTGGTGAGAAAGTCTGCGAGCTTCCGGGAAGTAAGTGAAACCTG - 3'

<sup>1</sup> número de referencia de dbSNP

[0135] **Recogida y procesamiento de muestras.** Se obtuvieron muestras tisulares placentarias de primer y segundo trimestre de cuatro mujeres embarazadas que portaban fetos con trisomía del 18. También se recogieron muestras placentarias de ocho mujeres embarazadas de primer trimestre que portaban fetos cariotípicamente normales por tomas de muestras de la vellosidad del corion (CVS). Las muestras se almacenaron en RNAlater™ (Ambion®, Austin, TX) inmediatamente después de la recogida y se mantuvieron a -80 °C hasta la extracción de ARN. Se extrajo ARN total usando Trizol (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La muestra de ARN extraída se trató con DNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para eliminar cualquier ADN contaminante.

[0136] **Amplificación por PCR y transcripción inversa.** Se transcribieron de forma inversa 0,625 microgramos de ARN placentario en un volumen de reacción de 20 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoScript, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). La transcripción inversa se realizó usando el cebador de PCR inverso con la secuencia mostrada en la Tabla 14.

[0137] Para amplificación por PCR, se usaron 20 µl del ADNc placentario en un volumen de reacción total de 40 µl. Cada reacción contenía tampón de PCR HotStar Taq 0,6X con Much 0,9 mM (Qiagen), 25 µM de cada uno de dATP, dGTP y dCTP, 50 µM de dUTP (Applied Biosystems), 200 nM de cada uno de los cebadores directo e inverso (Integrated DNA Technologies) y 0,02 U/µl de Taq Polimerasa HotStar (Qiagen). Las secuencias de cebadores de PCR se muestran en la Tabla 14. La reacción de PCR se inició a 95 °C durante 7 minutos, seguido de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 56 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1 minuto durante 50 ciclos, y una incubación final a 72 °C durante 3 minutos.

**Tabla 14.** Secuencias de cebadores para transcripción inversa y amplificación por PCR del gen *SERPINB2*

Cebador	Secuencia (5' a 3')
Cebador de PCR directo	ACGTTGGATGTGATGCGATTTTGCAGGCAC
Cebador de PCR inverso	ACGTTGGATGCAGACTTCTACCAAACAGC

[0138] **Detección de SNP por reacción de extensión de cebadores.** La reacción de extensión de cebadores se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 3. El producto de PCR se trató en primer lugar con fosfatasa alcalina de camarón (Sequenom, San Diego, Estados Unidos). Se mezclaron cuatro microlitros de cóctel de extensión de bases que contenía cebador de extensión 771 nM (Integrated DNA Technologies), 1,15 U de Thermostable Sequenase (Sequenom) y 64 µM de cada uno de ddATP, ddCTP, ddTTP y dGTP (Sequenom, San Diego, Estados Unidos) con 5 µl de agua y 5 µl del producto de PCR. El perfil térmico fue de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 94 °C durante 5 segundos, 52 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 5 segundos durante 85 ciclos. Las secuencias de los productos de extensión de cebadores para cada alelo de SNP se muestran en la Tabla 15. Los pesos moleculares de los productos de extensión finales se detectaron por el espectrómetro de masas MALDI-TOF como se ha descrito



en el Ejemplo 3. Se determinaron las relaciones de las frecuencias de picos para los dos alelos de SNP en fetos heterocigotos para el SNP.

**Tabla 15.** Secuencias y pesos moleculares del cebador de extensión y los productos de extensión esperados para el SNP codificante del gen *SERPINB2*

	Secuencia	Peso molecular (Da)
Cebador no extendido	TCAATGCATCCACAGGG	5179,4
Producto de extensión para el alelo A	TCAATGCATCCACAGG <b>GA</b>	5476,6
Producto de extensión para el alelo G	TCAATGCATCCACAGGG <b>GGA</b>	5805,8

Las letras en negrita indican los restos de dNTP y ddNTP añadidos al cebador de extensión

Desviación de las relaciones alélicas de transcritos de *SERPINB2* en las placentas con trisomía del 18 con respecto a las placentas normales

**[0139]** Se compararon las relaciones de SNP de ARNm de *SERPINB2* en las placentas de embarazos cariotípicamente normales y con trisomía del 18. La relación se calculó dividiendo la cantidad relativa de alelo G (alelo de mayor masa) con la cantidad relativa de alelo A (alelo de menor masa). Como se muestra en la Figura 12, todas las muestras de trisomía del 18 mostraron relaciones alélicas que se desviaron de las muestras normales sin solapamiento. Las relaciones alélicas de las muestras con trisomía del 18 se separaron en dos grupos. Las muestras con trisomía del 18 con un alelo extra G mostraron relaciones alélicas mayores que el intervalo normal, mientras que una muestra con un alelo extra A mostró relación de alelos menor que el intervalo normal.

**Ejemplo 6: detección de fetos con trisomía del 13 usando arn expresado en fetos en placentas por extensión de cebadores y espectrometría de masas**

**[0140]** Para demostrar que pueden detectarse trastornos cromosómicos adicionales usando otros genes, se investigó el *colágeno de tipo IV alfa 2 (COL4A2)* (número de referencia de GenBank: X05610) con respecto a la capacidad para detectar trisomía del 13. Los ensayos de reacción de extensión de cebadores permitieron la determinación del genotipo de SNP de las muestras tisulares placentarias. Las muestras se procesaron usando espectrometría de masas para diferenciar los diferentes alelos de ARN-SNP, y determinar los niveles de expresión relativos de los alelos de *ARN-SNP* para calcular la relación de alelos. La diferencia en las relaciones de los alelos de un SNP de *COL4A2* para embarazos con y sin trisomía del 13 es suficientemente grande para que la detección de la trisomía del 13 en el feto sea posible usando muestras de ARN placentario.

Determinación de la relación de SNP de ARNm de *colágeno de tipo IV alfa 2* en placentas

**[0141]** Se seleccionó el ARNm de *colágeno de tipo IV alfa 2 (COL4A2)* expresado en placentas. El gen *COL4A2* se localiza en el cromosoma 13. Se identificó un SNP polimórfico (Tabla 16) localizado dentro de la región codificante del gen *COL4A2* a partir de una base de datos pública y se marcó como objetivo para el desarrollo de ensayos.

**Tabla 16.** Un SNP polimórfico dentro de la región codificante del gen *COL4A2*

SNP	Secuencias
COL4A2 (rs7990383) <sup>1</sup>	5' – GACGAAGCTATCAAAGGTCTTCCGGGACTGCCAGGACCCAAGGGCTTCGCAGGCATCAA CGGGGAGCCGGGGAGGAAAGGGGACA <b>[G/A]</b> AGGAGACCCCGGCCAACACGGCCTCCCTGG GTTCCC AGGGCTCAAGGTGAGGAGCAATTTTCATCATGAAGCTGGCAAGACACTCTGAGGCCT CCCCA - 3'

<sup>1</sup> número de referencia de dbSNP

**[0142] Recogida y procesamiento de muestras.** Se obtuvieron muestras tisulares placentarias de primer y segundo trimestre de tres mujeres embarazadas que portaban fetos con trisomía del 13. También se recogieron muestras placentarias de siete mujeres embarazadas de primer trimestre que portaban fetos cariotípicamente normales por toma de muestras de la vellosidad del corion (CVS). Las muestras placentarias se almacenaron en RNeasy<sup>TM</sup> (Ambion®, Austin, TX) inmediatamente después de la recogida y se mantuvieron a -80 °C hasta la extracción de ARN. Se extrajo ARN total con Trizol (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN extraído se trató con DNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para retirar cualquier ADN contaminante.

**[0143] Amplificación por PCR y transcripción inversa.** Se transcribieron de forma inversa 1,25 microgramos del ARN placentario en un volumen de reacción de 40 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoScript, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). La transcripción inversa se realizó usando el cebador de PCR inverso con la secuencia mostrada en la Tabla 17.

**[0144]** Para la amplificación por PCR, se usaron 40 µl del ADNc placentario en un volumen total de 80 µl. Cada

reacción contenía tampón de PCR HotStar *Taq* 0,6 X con MgCl<sub>2</sub> 0,9 mM (Qiagen), 25 μM de cada uno de dATP, dGTP y dCTP, 50 μM de dUTP (Applied Biosystems), 200 nM de cada uno de los cebadores directo e inverso (Applied Biosystems) y 0,02 U/μl de *Taq* polimerasa HotStar (Qiagen). Las secuencias de cebadores de PCR se muestran en la Tabla 17. La reacción de PCR se inició a 95 °C durante 7 minutos, seguido de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 56 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1 minuto durante 50 ciclos, y una incubación final a 72 °C durante 3 minutos.

**Tabla 17.** Secuencias de cebadores para transcripción inversa y amplificación por PCR del gen *COL4A2*

Cebador	Secuencia (5' a 3')
Cebador de PCR directo	ACGTTGGATGAAGGGCTTCGCAGGCATCAA
Cebador de PCR inverso	ACGTTGGATGACCAATGTTGCCAGGCACTC

- 10 **[0145] *Detección de SNP y cuantificación de relación alélica por reacción de extensión de cebadores.*** La reacción de extensión de cebadores se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 3. El producto de PCR se trató en primer lugar con fosfatasa alcalina de camarón (Sequenom, San Diego, Estados Unidos). Se mezclaron cuatro microlitros de cóctel de extensión de bases que contenía cebador de extensión 771 nM (Integrated DNA Technologies), 1,15 U de Thermosequenase (Sequenom) y 64 μM de cada uno de ddATP, ddCTP, ddGTP y dTTP
- 15 (Sequenom, San Diego, Estados Unidos) con 5 μl de agua y 5 μl del producto de PCR. El perfil térmico fue de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 94 °C durante 5 segundos, 52 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 5 segundos durante 100 ciclos. Se muestran secuencias de productos extendidos de cebador para cada alelo de SNP en la Tabla 18. Los pesos moleculares de los productos de extensión finales se detectaron por espectrometría de masas MALDI-TOF como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se determinaron las relaciones de frecuencia pico para los dos
- 20 alelos de SNP en fetos heterocigotos para el SNP.

**Tabla 18.** Secuencias y pesos moleculares del cebador de extensión y los productos de extensión esperados para el SNP codificante de gen *COL4A2*

	Secuencia	Masa (Da)
Cebador no extendido	GTTGGCCGGGGTCTCCT	5209,4
Producto de extensión para el alelo G	GTTGGCCGGGGTCTCCT <b>C</b>	5482,6
Producto de extensión para el alelo A	GTTGGCCGGGGTCTCCT <b>TG</b>	6131,0

El cebador de extensión hibrida con la hebra inversa de la secuencia.  
Las letras en negrita indican los restos de dNTP y ddNTP añadidos al cebador de extensión

- 25 Desviación de relaciones alélicas de transcritos de *COL4A2* en las placentas con trisomía del 13 frente a las placentas normales

**[0146]** Se compararon las relaciones alélicas de ARNm de *COL4A2* en las placentas de embarazos cariotípicamente normales y con trisomía del 13. La relación se calculó dividiendo la cantidad relativa de alelo A (alelo de mayor masa) con la cantidad relativa de alelo G (alelo de menor masa). Como se muestra en la Figura 13, todas las placentas con trisomía del 13 mostraron relaciones alélicas que desviaban de las muestras normales sin solapamiento. Las relaciones alélicas de las muestras con trisomía del 13 se separaron en dos grupos. La muestra de trisomía con un alelo A extra mostró una relación alélica mayor que el intervalo normal, mientras que las muestras con un alelo G extra mostraron relaciones alélicas menores que el intervalo normal.

35

**Tabla 19.** Secuencia genómica de locus del gen *PLAC4*.

Este locus del gen *PLAC4* abarca las coordenadas de nucleótidos 41469028-41480585 en el cromosoma 21 basándose en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el Buscador de Genoma de UCSC ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)).

5

Cr21: 41469028-41480585

Posición de base<sup>1</sup>

```

41469028   TGGGATGTTTTAGATTATTTATATATGGAATCATATACCTGCACCTAGAAATATACAA
41469088   CCTCGGCGCTGCCATTGCAGGAAGACAAAGAGACTGTCTAGAGAGTAACGTGGCGATGCC
41469148   CTGGGCAGCTCCATCATTCCAGGGTACCATAAAGGGAAGTGGGAATGCACACTCCATCTG
41469208   TTTACGCTTAGGCTGAAAGTGGCAGGGGAGAATTTACACCTGGCCTGCAAAGGCAGCC
41469268   TTGTGTTCCCACTTCAGAGCCCCAAGCTTCCAAAGCCAGTGTCTGGGAATGGCCCTGT
41469328   TGGCAGCAGGCAGGAGACTGGTGCAGTGTGCCAGCTGTGCAAACCCACCAGACTGGTG
41469388   CAGTGTGCCAGCTGTGCAAACCCACCAGCAGCACCCACCAGCAGCCAAAGAAAACA
41469448   ATTTCTAAAGCAGCCCCAGGATTTTCATGCCACGGGGTGGTGGGGTAGGAGGAGGTG
41469508   GAAAGCATTGAATCAGAAAGTCTTCCAGGTACCAGCAATGCCAGGGTTAATATGGTCTGG
41469568   CTTGCTTTTCAGGTGAGCACCTGTAGCTGGCAGGAAAGTGGCTTCTTGGTGGAGGTGGGC
41469628   ATGAATTCAGAAAGCCTTGGAGAGACATCCAGAGCCCTTCCACTACATCGTGTGCCCTC
41469688   CTGGGGAAATCCTAAGCTTTTTTTGAATCAGAAAAGCCACTGACAAGCAGACAGAATTG
41469748   TGTGGCTTGGCAGTGAATGGAGAGCTAGGTGCTTTGGGTACTAGTCCCAGAGCTGTACT
41469808   TTGTGGAATGTTGGGTATTGGAGAGAAGTCAATTTGAGCTGTCTGAGCCCTCTGTCCCTCA
41469868   TCTGTAATCAGGGAATTTGAACAAGTGACCTCAGATTCCTTCTAGAAGCTCTAAACAGTC
41469928   AATGATATCATCTATTTTCATTTGAGAGAATCTCCATAGCTCTAATTTTTGCCCCAGAC
41469988   CAATCTGCTTCAGCTTTGTGTGGGTGCAACACCTGGGGTCTGTAAAATGCAGAATCGG
41470048   ATTCAGTGACCGAGAGCAGAGCTGAGGGTGGCTGCTGCCAGCTCACAGGTCACACTTGG
41470108   GTGCTTGTCTTCTTCCCAAACAGCTGCCGATGGTTCCCTGGAAGAGCAGGAATACCTT
41470168   GCAGAAGGGCTAGAAATAGAGATTCCCATATGCAGTCCAGACTTATTGGGTGAGCCTGT
41470228   CTGCACCTAGGACCTGAGAATCTGCATTTTATATATCCCTTGAGTCCCTTTAAGCAGCC
41470288   ACGCTGGCCCCAGCCATTGGACTCTATTTGGAGGCCACTGCAGAGGCCAGATGCCCTCTC
41470348   GCTCGGCGTTTCTGTGCAGAAAGGCTGTGTTCTTTCTTCTTCTAAATACTCTTCTTA
41470408   GGTAAAGTGTCTTCTTCTTTGCCCATCTAGAAAATCTCCACCTCAAGCAGGTCTGTGTT
41470468   CCAAAAATCCTCGTGTGGGCAAGTGGAAAACACGCAGTTTTTTCTAGGGTCTCATTTC
41470528   TGAGGCGGTGCTGCTGAAAATCTGGTGTGAACGTGTGTTTTTGGAGATTTCCAGTCTAT
41470588   CACAGGGCCACAAGGTGTAATATCAAGAAAATGAATTAAGTAAAGGCAAAGTGAATA
41470648   AGACATACAAAATACAAGTGTCAATCTTTTATTCTTAGTTGGACAGATAGTCCATTTCT
41470708   TCTACACTGGTCCACCGTTTTCTGAAGCTTCTGTAAATGATCAGTGGTTACCTTGTGGC
41470768   CAAGTAACTGCAAATCCCTCCTCTACAAAGTGTGCTTGCTCCAAGGCAGTGCAAACCTAGA
41470828   AGTTGTTACAAATGGTTCCAGTAACAAATTTGTTTGGCGGCCTTTTCCCATGAATGAGAC
41470888   AGTGGTTATTTTTGCTAAAGCAGAAAGGAATGTGATACTATTGGGCTGTGTTTTGCCCT
41470948   CTGGAGTAATCCTGCTTGGGAAAATGGAGGCTTGTTCAGAAATGCAGAAATCCCTGTTA
41471008   AATTAGGCAGTCTTGGGCTGGAGGACGTGTGCTCCTCCCTCCCAAGTGCCTCACAACTCACA
41471068   TCTCTAAAGGCCACTCAGGTGGGACCCATCAAGACATTGAAAATCGACAGAGGAAGGC
41471128   AGGAAGGGGAGAGGATCGAACCTGTCAAATAGATATTAGAAAATCTGTGCTCTAAAAT
41471188   AAGGCAGCCCTTCCCTCACAGCACACTTATTCTAATTTCAACAGGACTCCTAGTCTTGC
41471248   CCCACAGCGTCACAGCCTACAGCAAATTAGAACTGGGGTGGGGGCGGATATTATTCCA
41471308   CCAGTAATACCTTGGGACGGGGCACACAAGATGTTTGGCTCCTACCTCTCTGTCACTT
41471368   TCCCAAGAAAGGTCAGATGAAACAGTGTGCGTTTATGGTATTGCGAGAGTTAAGTGA
41471428   CTGCGGTGATTAGAACCTTAGCCTCGCGCAGCGTCAGCCGTGTTGGTAAAGTGTCCATAA
41471488   ATCTTCGTTTAGAAAAGTGGCAAATTCAGGCTGCTAGTAACAAGGAGGGAAGACAG

```

41471548 ACAAAACGGAACAGCAACAACAGAAAACCCAAGAACTAGATGCCCAACAATCTGGGTCTG  
 41471608 TATCTTGAAGGAATGTGCATCCTGTCTCTGACTGCAAACCCAGGCCTTCTGTGGCCCCA  
 41471668 CGATGCTGCCTCCTAGCCCTCCTAAGGTGGGAATGGAGCTTTACCCCTTGGTGGCAAACA  
 41471728 GACCTGGCTCCATGGATCTCAACCTGGGGTGATGTGTCCCCACCCAGGGGACATCTGG  
 41471788 CATCCTCTGGGGACATTTTGAGTTCTCACAACCTAGAGGGTGCTACTGGCGTCTGTGGG  
 41471848 TGGAGACTGGAAGTGCCTGCTCGGCATTCTTTGCCGTACAGGGCAGCCCCACAACAAGA  
 41471908 ACGATCTGGTCCAAAATGGCAACCATGCCAAGATTGAGAAATCCTGGTTACTCGACACAG  
 41471968 CAGGTCTGGCTGGCCTAGGAGTTGCTGCCAGAGAGGCAAAGGGAGAATGTCCAGTGGAAA  
 41472028 CAGCTGCCCTGAGCATAACAGGCACGCTGACACCTGCTGATTCCCCATCCTTAAGGTCC  
 41472088 TGTATTGTTTCTAACACCAGTGGATCTTCTTCCAGATGCATTAAAGTGTGAGAAGAGT  
 41472148 TAAAAATCACTTATAACTGGAGTGAAGTGGGGTTAAAGAGGAGAAAAAATTTGAACCTGA  
 41472208 CTCAAAGGATGAGCATGTTTTCTTTCTTTCTTCCGGCACATTGGCTGGGTGTGGCGGCTC  
 41472268 CATGCCATTATCCCAGCACTTTGGAAGGCCGAGGTGGGAGGATTGCTTGAGGTTAGGAG  
 41472328 TTCAAGATCAGCCTAGGCAACATAGCAAGTCCCTATCTATATAATTTTTTTTTAAATTA  
 41472388 GCCAAGCTTGGTGGTGCATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGGAT  
 41472448 CACCTGAGCTCAGGAGTTCAAGGCTGCAATGAATTACGATTGTGCCACTGCACTCCAGCA  
 41472508 TGTGCAACAGAGCAAGACCTTGCTCAAAAACATATTAAGCACCTACTGCATGTCCAGGGCC  
 41472568 TTGGTCTAAGCCCTGGTATGCAACAGTCAACTAGACAGAGAGAGTCTTGGCTTTTACAGA  
 41472628 ACCTCCCTTATAAGGAAGACAGATTGTCAAGGAAGTAAACAGACTTTTAGAGGAGTGTCT  
 41472688 GTGAGACAGTGCATGTGGGAAGGGGTATTGGTGAAGAATCCTGCTTTATAAGGGCGGT  
 41472748 TATGGAAGACCTCTCTGAGGAGTGCATTTGAGATGAGATTGGCTTGAGGAGACTGAG  
 41472808 CCTFCAGAAGTTAGGGAAAGCGTGTCCAGGCTGCAGCCAGGGAGGTGAAGACTTGAGGG  
 41472868 TGTCAGGGTGAGGAGTGAAGGTGTCCAGGGTACTGAGGGTGCAGGGTGAGGAGTGAAGG  
 41472928 TGTCAGGGTGAGGAGTGAAGGTGTCCAGGGTGAAGGAGTGAAGGTGTCCAGGGTGAGGAGT  
 41472988 AGGGTGTCCAGGTTGAGTGAAGGTGTCCAGGATGAGGAGTGAAGGTGTCCAGGGTGAGGA  
 41473048 GTGAGGAGTCCAGGGTGAGGAGTGAAGGAGTCCAGGGTGAGGATTGAGGGTGTCCAGGGT  
 41473108 GAGTGAGAGTGTCCAGGGTGAGGAGTGAAGGATCCAGGGTGAGTGAAGGTGTCCAGGGT  
 41473168 GAGGAGTGAAGGTATCCAGGGTGAAGGAGTGAAGGATCCAGGGTGAGTGAAGGTGTCCAGGGT  
 41473228 AGTGAACGTGTCCAGGGTGAAGGAGTGAAGGATCCAGGGTGAGGAGTGAAGGTGTCCAGGGT  
 41473288 GGAGTGACGGTGTCTGGGGTGAAGGAGTGAAGGATCCAGGGTGAGGAGTGAAGGTGTCCAGGGT  
 41473348 GAGTGAGGGTGTCCAGGGTGAAGGAGTGAAGGATCCAGGGTGAGGAGTGAAGGTGTCCAGGGT  
 41473408 GCGCAGCAACTCTTTCATCTAGTTTAAAATTGTGCTCTGAGGTTAGATTTTAGTAGAAC  
 41473468 AAGGCCTTACAAAGAATGTGAAAACATTGTGCTTCCCTGCTTACAGGCAATTAAGGAGGA  
 41473528 GAATCAAGCTGAGGGTGCCCTGTTGTTGGGGTGGGGTGGAGAAGACCACAGAGACTATTGTG  
 41473588 TGTTTTATTCACAGTGTCTTGGGCTGCTTTCTCCAGAAATGTCCCTGACACATGGATGT  
 41473648 AAGTGTGGCTAGTTTACTGGGAGATGATCCAGTGTGAGGACAGGCGAGCCCTAAGAT  
 41473708 TGAAGCATAGCCCGGAGGGTCTTAGCTTTGCCAGGAAGGAACTCAAGGGCAAGCCAG  
 41473768 TGGTGTAGCAACTTTTATTGAAGCGCCGGCTGTGCACAGCAGCAGCAGAGGCGCTGCT  
 41473828 CCTTGCAAAGCAGGGCTGCCCTACAGGCTGTGCGCCACAGTAGCAGCTCAGAGGCAGTT  
 41473888 CTGCAGTGGTATTTGTATCCACTTTTAATTATATGCAAATGAAGGGGCAGTTTATGCAGA  
 41473948 CATTTCCAGGGTGAGGGTGGTAACTTCTGGGTGCTGCCAGAGCCATGGTGAACCTGACTTG  
 41474008 ACACAGGTCGGTGTGTCTATGGAACTAGCATCTGCCCTGGACCTATTTTAGCTAGTGC  
 41474068 TCAGTTTGGTCTGAGTGCCTGAGCCCCACTTCCAGAGTTGAGTCCCACCTCCTACCTCAT  
 41474128 TCCCCCTCAGAGATTAGATACTCCTCCTTAATCTTAAGGGGGCTGCAGAAGGGCGGAGA  
 41474188 TCTGTTTTCCGTAACCTACTTCTGCTGAGTTTATGGACGTAGGCCCTGCCCTGGCACTGGA  
 41474248 GGAGTAAAAATCTCTGGATACCTGATCTAAGGAGCCCAGAGGCAGGACGATTTCAATCTC  
 41474308 CGTGTCACTGGACAGGATGGGCTGGAAGCCTTGTGCCAGCATTGTCTCTGGAACCTGTGGT  
 41474368 AATCTAGAATACACAAACTTTACTAAGAGGTTAAAGAAGCAAGGACCAAACATTTGTAAC  
 41474428 AAGACAGTTGTCAAAGGTCCTAGAAGAGGTGAAAAACAGGTGAGACTTGGGAAGGCACCTT  
 41474488 TTGATGGTTGACCAGATATAGTTGGGGCAGTCCCTGGTTATATCTATGTAACCTAGGTA  
 41474548 GCTTGCTCATAGATCTTTTGAATGTTAACCTCAACCTGTCCAGGTTAATATATGTGCAG

41474608 CAGGTTTTATTAATAACTGCACAAGACCCACCTTGTTGAGCTAGTAAATAATCCAATGC  
 41474668 TAGTCTGTTATCAACAACACTACATTTTCCAGAGTCTGGGGAACTCTTGAATTCCTTTAAT  
 41474728 GCCTGATCTCCGTTGGTGGCTAAGGATTCTAGGATTTGAGCCAAGTTCTTTAGCGTTAAC  
 41474788 TCATGGTAGGCAAAGCCACCCAGGGTGCCTGCTAGTCCATTGCCACCTGATTCCCTGCC  
 41474848 AGAATTAGTTTTATTGCTTACTTATTTCTGATATTCTTGGGTCCCTAGCGTTATAGATTG  
 41474908 TGACCCCTGGAGGGGTAAGAGTGGCCAACGTTCAATCATGTCAGTTCCAAGTTTTTTAGA  
 41474968 TACAAGGGAAAGCTATTCCTTAAAGAAGAGGTGACTCCTTAGGGAGTTGGAGTGGTTACA  
 41475028 GGGTGTGACTTCTTCCCATTCATAGTCACAAACAAAAATGAACCCAACTAGGGCACCAAG  
 41475088 AGAAGCCCTGCGGGGTGCGATGTTTATACTTCATTGCCAGGTTGGGTCTATAGAGATATT  
 41475148 TTCCACCTGTTCTCATGGTGGTGGTTGAACAATCTTTGTTTTCTAGAAGAAGGTAGTACT  
 41475208 GTCACCTTCCAGATCAGGCAGTTGTTTTCTTTGTATGTTCCCATCCGGGAGAAGGTA  
 41475268 CCATATATGGTCTTTTTCACTACAAATGGAATCTCATTTACCTCCCCGTGGTCTTGGAAA  
 41475328 CTTGGCAACTAGAGTTGGACCAGAGCATCGCAGGGAAGCTTCCACTTTTGTGTCATTAAT  
 41475388 GCAAGAGTGGATGCAAATGTTAGAGTTATGAGTGCCTGGAGATATAGATGCCCAACTTC  
 41475448 CCAGATTCCGATAATAGTGGTCAGGGCAGGGGGACAGCAGGGTCCAGGGGGATCCACTA  
 41475508 AGTGGGGAAGAGTTCCACTTCACAATAGGGGTTGGGTATTTTGGGGTGCTATGGTTAGT  
 41475568 TAGGAGGTCTGGGGACATGGTCTGAGATTTTCCAGATAGGTCCGGAAGATGAAACTGTCT  
 41475628 ATCTGGGGGTGTTGATGACAAAATCTGGCAGCCATAAAGATGATTCTATGATGCTATAAT  
 41475688 TTTTGAAATATTTACTGTAGAATTTTGTCCACCTCCCTGTCCACATACACACTAGCTTA  
 41475748 GGTTAAATTAGAAGAGCAAACAGAATTAACAGTGGCATCATGGTATCTGGTTGGGTCTTAG  
 41475808 AGTAGCTTCTATACCCAACAAGCCACAGGAGATGTTTCCAGGAGGAGGTGGCTGGTTA  
 41475868 AAGCCATAGAAAGGAAGTACTACAGTCAGGAAGAAGAGCAAGATCAATGCTCCTATTCCC  
 41475928 ATCTACAGCATTACATTACCTCTTCTGGCTGAGTGTGATTATTTTAAATAGGTAGCAGA  
 41475988 GGTCTTCCAAAGCTTTACTGATATTGGTTGTGGTTGTAGTGCCCTTCTTTGTGCCTGTG  
 41476048 ACTCATAAGAAAAGGGTTAGTCTGATCTGTGTGCCCAAGTAGGTGTTCCCTGAAGTT  
 41476108 TAACAGCAGTGGGGTACTTAAACAATACCTGATAAGGCCCTTCCATTTCAATTGTAATTG  
 41476168 ATTCTTGGGGTATCCCTGTCTTTACCTGTCTTTAAGGTTTTAGCAAGACTAAGTCTCCT  
 41476228 GGTGAAACCGGGGAGCTATTTTTCTTTTGTGGGAAGGACAGTATTTTATTTTTATATT  
 41476288 GGAGGGCTTTTTGAACCTGTCTTAAATCTAAAGGGGAGGGGGGAAGGTTCATATAGGTA  
 41476348 ATTACTACAAGCCAAGACCACAGCAGCTCAACACATAAAATCCATAGACAAATCAGTTTT  
 41476408 ACAACCCCATTTCTGGCTTCTAGTTCTTGGCTTCCATACTGCTCAAAGGAGTTCAGG  
 41476468 GCCAATGAGTGGCCGCCACCTCCACACTCATGCACTGTGCAGATGACTTACACAGACCA  
 41476528 TCTACAACATAGCTGAATTTCTGACATGTTCTATACTACCTCTTTCTTAAAGTTATTTT  
 41476588 ACTCTAGGATAGGGAATTTACTATACAGGATTCCTCCACATATAAAATTAATCTTTCTTT  
 41476648 ATATCCTTCTTGCAAAACAAACAAAAATACATTTTCTATTATAATATTCTTTACATC  
 41476708 TCTCTTTTCTACTCACTGGTCACTCATGTTTTGAACTCCCATTTAGTAACTTCCGGAT  
 41476768 TAGACAAAAATTTTTTCTCAATAAAGAATACATTTCTTTAGCACATTTTATGGAAACCT  
 41476828 AGGAAGGAAGAAGTCATGAACCTCACACTAGACATTTGTCATTCTATAACTGAGAACCATT  
 41476888 CTACCATTTTATGATTTTAAACCACACATTAAGCATATCCATTTACGTGTATTTAATTA  
 41476948 TTTCACTTTTAACTTTATCTAGATCACCGAGAACCAAGGTACCATGCAAAGCTGGTCACC  
 41477008 ATTTAAAGCCATTTTAAACCATTTTAAAGCCTATGAACATCAGTGAATTTACCTAGGTA  
 41477068 ATCCTAAAGTTAAATTTTAGAAGATACAAGATTTCTTTCAAACATAAAGCTTTTCAAGT  
 41477128 TCTTATTTGTTGAATGTATGAGTGTCTTTTATCTATAAGCCAGTTTGACAGCAGCTAG  
 41477188 ATGTAAACACACATCACAATACATGTACATATACCCAAAAACATATTAATAAAATGACCT  
 41477248 ATACAAGACAACTGGATTCAAGTTATTTACAGAACTGGGACCCATCTACCTGGCCAAATT  
 41477308 TTGTTTGGCCGATAGGTATGGAAAAAGGAAAGGAGGACAGGGAATCCCATAGCATC  
 41477368 AACTAAAAAGGGGAGGAAGCAAACCTGCATTGCTCAAAGGAGATTCTGGAGTCCCCACGC  
 41477428 CACTGGAGAGCACACTCAGTGGTGGAAATACCAAAGAAAAATGTTCAAGCGGCTGCTTAT  
 41477488 CTGCCACTGTGGAAAGCTGTCTCTGGGACAGTAAACTTACTTGAGCTAAGCAGCTCACT  
 41477548 GGGGCTAGTAGGAGAAGGTTAGCTCTAGTATTGATGGAAGCTTTTTGTTGTTATTGTTCT  
 41477608 CTCTCACCAGAGCAGTTAGGACATTTGCATTGCCAGGGGCCCTTTTGGGTATAGTAGGCG

41477668 CAGTGATTCTGGCCAGGGGTCAGCAAGTCAGGCATCAAGTCTTGTCTAGGCATCCCAGA  
41477728 TGCTAATTTTGTAAACATTTTCTCAAGATGAGTAATCCTGAGGGGCAAGGAGGCTTAAAGT  
41477788 CACTGTTAACAATTTGTAACCTTTTGGCTATTTCTTTTACTCCCCTCTTTGGCCCTGTCCC  
41477848 TGTTGTTGTAAACTTTAAAGGCTATGTTTAAGCGTCGTTTCATAGGACTTGAAGGTCCCA  
41477908 TTGCTGCTTTTGTAGATTCCCTCCTAATGTCAGGAGAAGATTGAATGAGAAAATGTATAC  
41477968 CCAGGAGAGCTTGCCCTTCTGGGGTGTCTGGGCCTGCATTAGTATATTTCTGAGTGCTT  
41478028 CAACTAAAAGACCCTGAAAACAGAGCGGGATTTTCATCTTTCCCCGAGTTACTTCTTTAA  
41478088 CTTTGTCAATAATTGACTGGCTTAAACCACACACTTTTCTCTACTTTTTTTTTCCCCACAG  
41478148 CACAGCAAGCGGATGACAATATTTGTAATCGTGGCAATTTGAAGACATAGTCAACGTA  
41478208 ACAAACTCTGTATAAGCTTTTCTGGTTTATCTGAAAACCTGGCCAATCTTTCTTTTAT  
41478268 AAGGTCATAATTAGACATGAAAAGTGGCATATGTACTCTTTGAGTGTCCCTCATTCCAT  
41478328 CAACTACTTTCCACAGTGGACACAGGCTTGACCTTAGGGGCTGATATGGAGCCCCACTCC  
41478388 TGGTGTACTGGTTGGGCTCATTTTCTTGGGCAGCAGAGGGTATAGGCTAGGGCTAGTTGG  
41478448 ATAAGGGGGAAAAGGTGCCTGATGATATGGGGTGGAAATCTCATTAGGGAATTGGCGAGAA  
41478508 CCCCCACTCAGGACTGGGGGACTGAAGAGACTCTGGGGAGGCTTATGAACCTTTCTATGGG  
41478568 GAGCAGCTAGGTGGGGATCCCTTATGCATGGCATTCTAATGCCTGGAAGTAACGTGATCC  
41478628 AGTATAGAGCCATAAAAGCCTGTACATAAGGGATCTCTTCCCATTTCTTCTCTTTTAC  
41478688 AAAATAAGCCTAATCGTAAAATATCACTATAGTATATAGAACCATGTTTAGGCCAGATAT  
41478748 ATTCTGTCATCTAATTTGTATTTAACCCAAATGGTGTGCAATACAAAATGAGTTCTTTT  
41478808 TCTTTAAGCCAAATTTGAATTTGCTCCAATAGCTTAAAAGACACCCTAGCGGCGAGTCCC  
41478868 TTGGGATACTCTTGTGTCCCCATGCCTATATTAAGGATCTCTCTACAGAGGGTTTTAT  
41478928 TAGCCCAAGTTTAGCAAAAGCCTAGTTACTCTTCCCTCTTAAATTCCTGTTCTTTAAA  
41478988 GGTGTAAATATAGATAGCAAGGTGTTATAAAAATGGATTATGAGCTACGAATGGGCAGTC  
41479048 GAATGTGGAGCCTAAATTCATAGAGATCTAGAGTTGGGTGAGAGGGGCTAAACAAT  
41479108 GGAGGAAGGGAAAGGGTAAACAGCGTTGCCAAGGGGAGACCTCAGAGGCTCTGACTTG  
41479168 CTGAAGAACCCTACCCAGTAGTGGAGATACTGAAAAAATATTTGGGCTGGCCACTTGTCTA  
41479228 CCACTGTAGGTGGCTGACTGCCAGGCCAGGAGCCTGGGAGCTCCCAATTCCTTTGACCAA  
41479288 GAGCAGCTTAGGCAAGGGAGTTATAAGACAGTACACAGGAAGGAGCTTGCAATTGGCTAT  
41479348 TAGGAAAATAACTCCTAACTTCAGGGTGGAAAAGACAAGACCAATATTCGCCTAGCG  
41479408 AAAGGGGTATAACCCACAATCCTAGAGGAAATGTCAGTGTAAAAACCCAGAGCATCTG  
41479468 GAGGGTGGCCTATAATACCGATGCTGAGAACCCAAAATGCCGTGCTTTGAGCAACAAGG  
41479528 ATGCCCTCGCCAAAGCAGCTGTGCACAGCAGTGCCAAAACCCCTGGGGTACCCAGTGGGC  
41479588 GGCCAACCCCGTGAACCCAAGACCAGGTTACAGAACATAGAACAACGTGACAACGTGACT  
41479648 CTGGTATCCCAGAGTCAACACAACAGGGGACCTCTCACAACCAAGTGTCTGCTTAAAC  
41479708 AATTGCCCAAATACAATTAACAGAAAGTCGAAAGCAAAACATAAGACTCCAAAACAAGACAT  
41479768 ACATGTTAGACTGAAAATGAAACCAAGTGGAGCAATAAAATGGAGTCAGAGGAGAAAG  
41479828 AACCAGGTGAAGGGGTGGCAAGAATGTGCTTCAAGGCACCTAAACCGTGGGGAAGTACC  
41479888 GCTTAGCCAAAGGCTTTTATTTCTTAGCTTACCTGATATTACTGGGGGAGGGTGCAAAGG  
41479948 GGACTCTCACCCATCCACAGAAGACAAAATGGCACCAGCCAGTCTTCCAGTGGGACCCG  
41480008 GGTGCAGGTCTCTCTAGGTTCCCCAGCTTGGGGGTGCTCAGCTTCTGTGCTGGGGGCTGG  
41480068 CTCGTTAGAGCAGTGGGTCCACACGAGGCAGCTGTACTATGGACACTTGGCTGTCCACT  
41480128 CAGTTTCACCACCTGCCAGGGAAAGATGATGGCTGTGAAAAGAGGCCTGGTTAGGGTTA  
41480188 GAGCTCGGTAGTGTAGCAGCTCTTATTTGGTACTTCTCAGTGTACAGATCTTACATC  
41480248 CTCAATCACAGACTGCTTACCCTCTCTGCTGTCTTGCCAACCTGCTGTCTCTTGTCTCT  
41480308 CACCAATTGCTGCCCTCTGTCTCTGCTGTCTTGCCTCTCTGCCAATFGCCACCATCTCC  
41480368 GCTGTCTTGTCCCTTTGCTGGTTGCCAGATGATGCAGGACAGGCAAGCCCCAAGACTGG  
41480428 GGCTTAGCCTGGGAGAGTTCTTGGATTTGCCAAAGATTCAAGGTGAGCTGGTGGTGT  
41480488 AGGCAGCAGCTTTCATGGAAGCAGCTGTGCACAGCAGCGCCAGAGATGCCGCTCCTTGCA  
41480548 GATCAGGGCTGCTCCATAGGCTGTGTGCCCTGAGTAGC

Fuentes en negrita: secuencia que se sabe o se predice que son las regiones transcritas del gen *PLAC4*.

Fuentes subrayadas: secuencia de referencia correspondiente al ARNm de *PLAC4* de la base de datos del NCBI

(NM\_182832)

<sup>1</sup>Coordenadas de nucleótidos en el cromosoma 21 basándose en el ensamblaje humano de mayo de 2004 (hg17) en el Buscador de Genoma de UGSC ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)).

5

LISTA DE ID DE SECUENCIAS

SEC ID Nº	Secuencia
1	GGCTGACATCACCATCCTG
2	TTGGAAGCCAGGACACAAC
3	AGAGCAGCAGCCTCTTCTTG
4	TGAGGATTGGTGGGAAAAAC
5	TTTTCCACTCCCAAGTCTGG
6	TTGCAACACCAAGAAAAAGC
7	CGACAGAG CAAGACCCTTTC
8	TCTGGCAAATACAGGTCATTG
9	TCATCAACGTGGTCAACAGG
10	GTGGACATCGTCTTCTGCT
11	AACGACAGTCTGCACGAGTC
12	TCACTCTCGTGCTTCTCGTG
13	GTGGATGGCAGTGAGTTGT
14	CAGGTAGGTCAGGAGCCTTG
15	GGCCTGAGATTCTTCACTGC
16	AAAATTAGCGGGACATGGTG
17	GACAAAGTCAAGTCCTTACCAA
18	GCGTTCACACCAGGTTT
19	(FAM)CGCTTCATCGACAACC(MGBNFQ)
20	<b>TGGACAAAGTCAAGTCCTTACCAAGCGCTTCATCGACMCCTGAGGGACAGGTACTACCG CTGTGACCGAAACCTGGTGTGGAACGCAG</b>
21	CAGGGCATCATCAATTTTCG
22	TGCTTCCCCACACCTTCA
23	(FAM)CAGAAGGAAAGTAATGGACCA(MGBNFQ)
24	<b>TGCAGGGCATCATCAATTTGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAG CATT</b>
25	GATCAACCAGGACACCATCAA
26	CCGTAGGCTTCGTGTTTCA
27	(FAM)CGCATCATCAAGGTC(MGBNFQ)
28	GAGATCAACCAGGACACCATCAACCGCATCATCAAGGTCATGAAACACGAAGCCTACGGAG
29	CCCTCACTACCAACCTGATCA
30	CCTTGGGTATTGCTTAATCGA
31	(FAM)TGCTTGCTGAAAATG(MGBNFQ)
32	<b>TCCCCTCACTACCAACCTGATCAATTTGCTTGCTGAAAATGGTCGATTAAGCAATACC CAAGGAG</b>
33	GGCAGCCACAACCTTGGACAC
34	CTCGGCCAGGCGCTT
35	(VIC)ACCAAGCGCTTCGC(MGBNFQ)
36	(FAM)ACCAAGCACTTCGC(MGBNFQ)
37	GGCGCCAGAAGACACGT
38	GTCGTGGCGCCCGT
39	(VIC)TGATGACCACCGCAAA(MGBNFQ)
40	(FAM)TGATGACTACCGCAAA(MGBNFQ)
41	ACGTTGGATGCTATGTGACCCGCTTCTACC
42	ACGTTGGATGGAGTTGCCATCTGAGAAGAG
43	ACGTTGGATGACCGCCTCATCAAGGAGAGC
44	ACGTTGGATGAAGTTGAGGTCATCGTCCCG
45	CTCTTCTTGGCAGCGCC
46	CTCTTCTTGGCAGCGCCA
47	CTCTTCTTGGCAGCGCCGGA
48	AAGACACGTGTGTTTGCAGT

(continuación)

SEC ID Nº	Secuencia
49	AAGACACGTGTGTTTGCGGTA
50	AAGACACGTGTGTTTGCGGTGGT
51	TTTACAAAATAAGCCTAATCGTAAAATATCACTATAGTATATAGAACCATGTTTAGGCC AGATATATTCGTC[A/G]TCTAACTTGTAT7TTAACCCAAATGGTGTGCAATACAAAATGAGTT TCTTTTTCTTTAAGCCAAATTTGAATTTGCTCCAATAGCTTAAAAGACACCCTAGCGGCG
52	CTCACATCTCTAAAGGCCACTCAGGTGGGACACCATCAAGACATTGAAAATCGACAGAAG GAAGGCAGGAAGGGGAGAGGATC[A/G]AACCTGTCAAATAGATATTAGAAAATCTGTGCTC TAAAATAAGGCAGCCCTCCCTCACAGCACACTTATTCTAATTTCAACAGGACTCCTAG
53	TCATTCTGAGGCGGTGCTGCTGAAAATCTTGGTGCTGAACGTGTGTTTTGAGAT TTCCA GTCTATCAC[A/G]GGGCCACAAGGTGTAATATCAAGAAAAATGAAACTACTAGAAAGGCAAAG TGAAAMGACATACAAAATACMGTGTCATTCTTTTTATTCTTAGTTTGGACAGATAGTC
54	TAATTGATTCTTGGGGTATCCCTGTCTTTACUCTGTGTTAAGGTTTTAGCAAGACTAAG TCTCCTGGTTGAAC[C/T]GGGGAGCTATTTTTCTTTGTGGGGAAGGACAGTATTTATTTT TATATTGGAGGGCCTTTGAACCTGCCTAAATCTAAAGGGGAGGGGGAAGGTTTATA
55	GTATATAGAACCATGTTTAGGCCAG
56	ACGTTGGATGGTATTGCAACACCATTGGG
57	ACGTTGGATGTAGAACCATGTTTAGGCCAG
58	AGGCCAGATATATTCGTC
59	AGGCCAGATATATTCGTC <b>A</b>
60	AGGCCAGATATATTCGTC <b>GT</b>
61	CCTTTCCCCCTTATCCA <b>ACT</b>
62	GTA <b>CT</b> GGTTGGGCTC <b>ATTTTCT</b>
63	(FAM) CCCTAGCCTATACCC (MGBNFQ)
64	<b>CAC</b> TTTTCCCCCTTATCCA <b>ACTAGCCCTAGCCTATACCCCTCTGCTGCCCA</b> <b>AGAAAATGAGCCCAACCAGTACAC</b>
65	<b>GTTCTGTGTTATATATAAAGAATTCTTTCTTTTCAAGGCACAAGCTGCAGATAAMT</b> <b>CCATTATCCTTCCGCTCTCTCAGCTCTGCAATCAATGCATCCACAGGG[A/G]ATTATTTACTG</b> <b>GAAAGTGTCTAAGCTGTTTGGTGAGAAGTCTGCGAGCTTCCGGGAAGTAAGTGAAACCTG</b>
66	ACGTTGGATGTGATGCGATTTTGCAGGCAC
67	ACGTTGGATGCAGACTTCTACCAAACAGC
68	TCAATGCATCCACAGGG
69	TCAATGCATCCACAGGGA
70	TCAATGCATCCACAGGGGA
71	<b>GACGAAGCTATCAAAGGTCTTCCGGGACTGCCAGGACCCAAGGGCTTCGCAGGCATCAACG</b> <b>GGGAGCCGGGGAGGAAAGGGGACA[G/A]AGGAGACCCCGCCAACACGGCCTCCCTGGGTTCCC</b> <b>AGGGCTCMGGTGAGGAGCAATTTATCATGAAGCTGGCAAGACACTCTGAGGCCTCCCCA</b>
72	ACGTTGGATGAAGGGCTTCGCAGGCATCAA
73	ACGTTGGATGACCAATGTTGCCAGGCACTC
74	GTTGGCCGGGGTCTCCT
75	GTTGGCCGGGGTCTCCTC
76	GTTGGCCGGGGTCTCCTTTG



## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de un trastorno cromosómico en el feto de una mujer embarazada, que comprende las etapas de:
- 5 (a) diferenciar alelos de ARN transcrito de al menos un locus genético de al menos un cromosoma de interés en una muestra biológica de la mujer embarazada que contiene ARN, en la que la muestra biológica que contiene ARN contiene ARN fetal;
- 10 (b) determinar la relación del número de moléculas que contienen dichos alelos de los transcritos de ARN; y
- (c) comparar la relación de la etapa (b) con un control estándar que representa una relación de alelos de muestras biológicas comparables obtenidas de mujeres embarazadas que portan cada una un feto cromosómicamente normal, en donde un aumento o reducción de la relación con respecto al control estándar indica un riesgo aumentado de tener un feto con un trastorno cromosómico.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el trastorno cromosómico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en trisomía 21, trisomía 18 y trisomía 13.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el trastorno cromosómico está en el cromosoma X o en el cromosoma Y.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica en la etapa (a) es un miembro seleccionado del grupo que consiste en sangre materna, plasma o suero materno, líquido amniótico, muestra de la vellosidad del corion, células nucleadas fetales o residuos celulares fetales aislados de sangre materna, orina materna, saliva materna, lavados del tracto reproductivo femenino y una muestra obtenida por celocentesis.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica en la etapa (a) es sangre materna o contiene elementos celulares o residuos celulares en la sangre materna.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el ARN fetal en la etapa (a) deriva de la placenta.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) se lleva a cabo usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).
8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) y/o la etapa (b) se realiza usando un miembro
- 35 seleccionado del grupo que consiste en una reacción de extensión de cebadores, espectrometría de masas, hibridación usando al menos una sonda, hibridación usando al menos una sonda marcada con fluorescencia, secuenciación directa, clonación y secuenciación y electroforesis.
9. El método de la reivindicación 1, en el que los alelos en las etapas (a), (b) y (c) se diferencian por variación de
- 40 secuencia.
10. El método de la reivindicación 11, en el que la variación de secuencia es un polimorfismo de un único nucleótido (SNP), un polimorfismo de inserción/delección o un polimorfismo de repetición en tándem sencilla.
- 45 11. El método de la reivindicación 1, en el que el ARN se transcribe de un miembro seleccionado del grupo que consiste en cromosoma 21, cromosoma 18, cromosoma 13, cromosoma X, y cromosoma Y.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el ARN se transcribe del cromosoma 21.
- 50 13. El método de la reivindicación 1, en el que el ARN es ARNm.
14. El método de la reivindicación 1, en el que el ARN se transcribe de al menos un locus genético seleccionado del grupo que consiste en *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)*, *superóxido dismutasa 1 (SOD1)*, *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)*, *subunidad O de la ATP sintasa mitocondrial (ATP5O)*, *familia BTG, miembro 3 (BTG 3)*, *uno similar a desintegrina y*
- 55 *metaloproteasa (tipo reprotolisina) con un motivo de trombospondina tipo 1, 1 (ADAMFS1)*, *enzima de escisión de APP 2 por sitio beta (BACE2)*, *intersectina 1 (ITSN1)*, *proteína precursora del beta amiloide (A4) (APP)*, *ATP sintasa, transportador de H<sup>+</sup>, complejo FO mitocondrial, subunidad F6 (ATP5J)*, *gen 5 de la región crítica del síndrome de Down (DSCR5)*, *específico de placenta 4 (PLAC4)*, *proteína hipotética BC005107 (LOC90625)*, *proteína ribosómica L17 (RPL17)*, *miembro 2 inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) (SERPINB2)* y *colágeno tipo IV alfa 2*
- 60 *(COL4A2)*.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el ARN contiene al menos un polimorfismo de un único nucleótido del locus genético.
- 65 16. El método de la reivindicación 14, en el que el ARN se transcribe de al menos un locus genético seleccionado

del grupo que consiste en *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)* y *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)*.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el ARN transcrito del locus genético del SNP de *COL6A1* es <sup>Arg850<sub>His</sub></sup> o <sup>Ser932<sub>Ser</sub></sup>.

18. El método de la reivindicación 16, en el que el ARN transcrito del locus genético del SNP de *COL6A2* es <sup>Val728<sub>Val</sub></sup>.

19. El método de la reivindicación 14, en el que el ARN se transcribe del locus genético para *específico de placenta 4 (PLAC4)*.

20. El método de la reivindicación 19, en el que el ARN se transcribe de cualquier variante del gen *PLAC4* tal como AF269287, AK027868, AK092431, BC093685, BC101615, BC101617, L13197, NM\_182832 y LOC191585.

21. El método de la reivindicación 19, en el que el ARN transcrito del locus genético del gen *PLAC4* contiene un polimorfismo de un único nucleótido o un polimorfismo de inserción-delección seleccionado del grupo que consiste en *rs3804026, rs4818219, rs7844, rs9015, rs13643, rs9305729, rs9305730, rs5019195, rs5019194, rs5844069, rs1049904, rs16998089, rs12482116, rs11909439, rs7278659, rs12106409, rs12106395, rs12106401, rs12106434, rs2183584, rs3949725, rs8130833, rs10222145, rs9981478, rs8130833, rs9977003, PLAC4-41471145 y PLAC4-41476236*.

22. El método de la reivindicación 1, en el que la mujer está en el primer, segundo o tercer trimestre de gestación.

23. El método de la reivindicación 1, en el que la comparación en la etapa (c) muestra un riesgo aumentado de que el feto tenga un trastorno cromosómico si la relación en la etapa (b) es mayor o menor en 1, 2 ó 3 desviaciones estándar que el control estándar.

24. El método de la reivindicación 1, en el que la comparación en la etapa (c) muestra un riesgo aumentado de que el feto tenga un trastorno cromosómico si la relación en la etapa (b) es mayor o menor en 2 desviaciones estándar que el control estándar.

25. El método de la reivindicación 1, en el que la comparación en la etapa (c) muestra un riesgo aumentado de que el feto tenga un trastorno cromosómico si la relación en la etapa (b) es mayor o menor en 3 desviaciones estándar que el control estándar.

26. Un kit para detectar la presencia de un feto con un trastorno cromosómico en una mujer embarazada, comprendiendo el kit:

(a) cebadores para amplificar una secuencia de nucleótidos originada de una especie de ARN transcrita a partir de un locus de interés seleccionado del grupo que consiste en *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)*, *superóxido dismutasa 1 (SOD1)*, *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)*, *subunidad O de la ATP sintasa mitocondrial (ATP5O)*, *familia BTG, miembro 3 (BTG 3)*, *similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con un motivo de trombospondina de tipo 1, 1 (ADAMTS1)*, *enzima de escisión de APP 2 por sitio beta (BACE2)*, *intersectina 1 (ITSN1)*, *proteína precursora del beta amiloide (A4) (APP)*, *ATP-sintasa, transportador de H<sup>+</sup>, complejo F0 mitocondrial, subunidad F6 (ATP5J)*, *gen 5 de la región crítica del síndrome de Down (DSCR5)*, *específico de placenta 4 (PLAC4)*, *proteína hipotética BC005107 (LOC90625)*, *proteína ribosómica L17 (RPL17)*, *miembro 2 inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) (SERPINB2)* y *colágeno de tipo IV alfa 2 (COL4A2)*, en el que al menos un cebador para la amplificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un transcrito anteriormente nombrado es específico de secuencia para el locus; y

(b) un control estándar que contiene una relación conocida de alelos transcritos de dicho locus que refleja la relación de dichos alelos en mujeres embarazadas que portan cada una un feto cromosómicamente normal.

27. El kit de la reivindicación 26, que comprende además:

(c) sondas de hibridación para diferenciar entre los diferentes alelos de cada especie de ARN.

28. El kit de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el control estándar es una solución que contiene ARN que codifica *colágeno VI alfa 1 (COL6A1)*, *superóxido dismutasa 1 (SOD1)*, *colágeno VI alfa 2 (COL6A2)*, *subunidad O de la ATP sintasa mitocondrial (ATP5O)*, *familia BTG, miembro 3 (BTG 3)*, *similar a desintegrina y metaloproteasa (tipo reprotisina) con un motivo trombospondina de tipo 1, 1 (ADAMTS1)*, *enzima de escisión de APP 2 por sitio beta (BACE2)*, *intersectina 1 (ITSN1)*, *proteína precursora del beta amiloide (A4) (APP)*, *ATP-sintasa, transportador de H<sup>+</sup>, complejo F0 mitocondrial, subunidad F6 (ATP5J)*, *gen 5 de la región crítica del síndrome de Down (DSCR5)*, *específico de placenta 4 (PLAC4)*, *proteína hipotética BC005107 (LOC90625)*, *proteína ribosómica L17 (RPL17)*, *miembro 2 inhibidor de serpina peptidasa clado B (ovoalbúmina) (SERPINB2)* o *colágeno de tipo IV alfa 2 (COL4A2)*, con una relación de la media establecida de la misma especie que se ensamblan artificialmente.

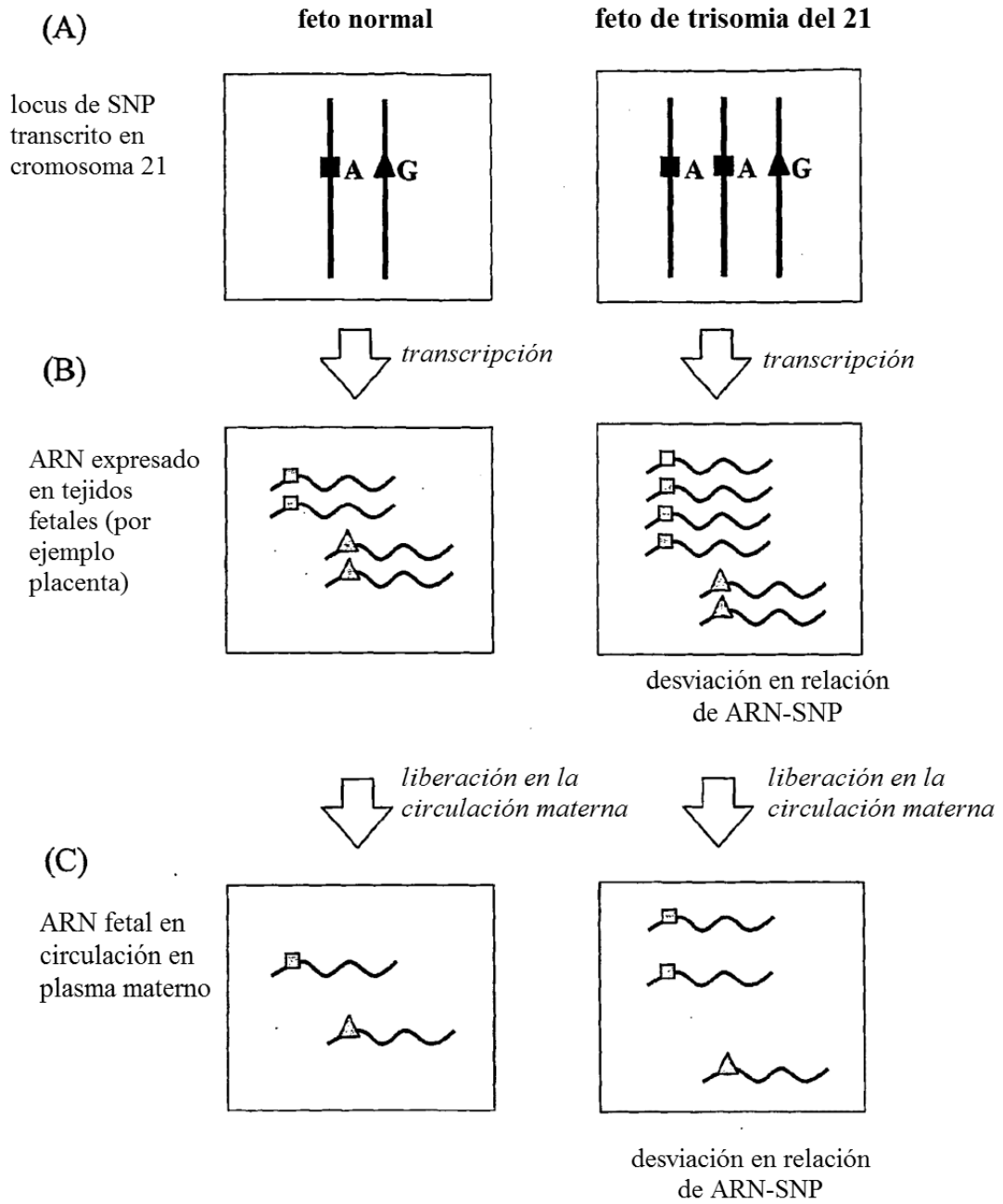
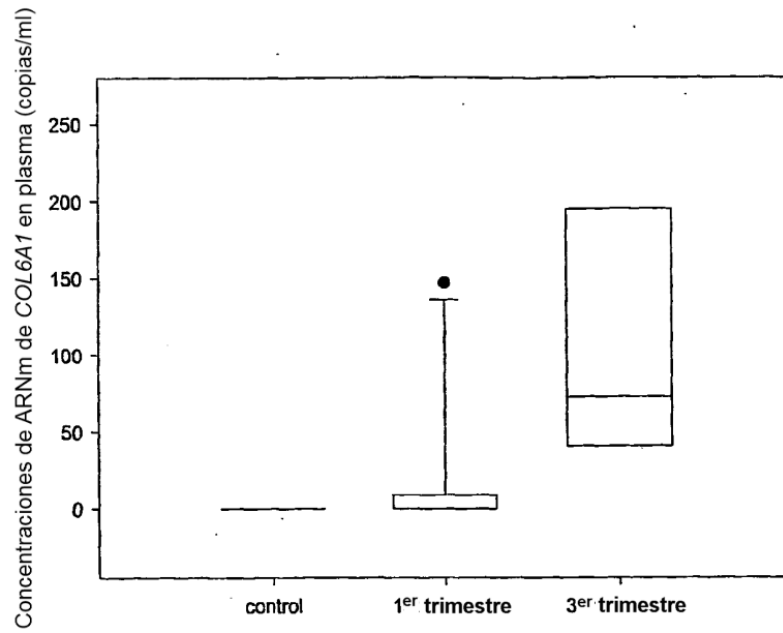


Figura 1

(A)



(B)

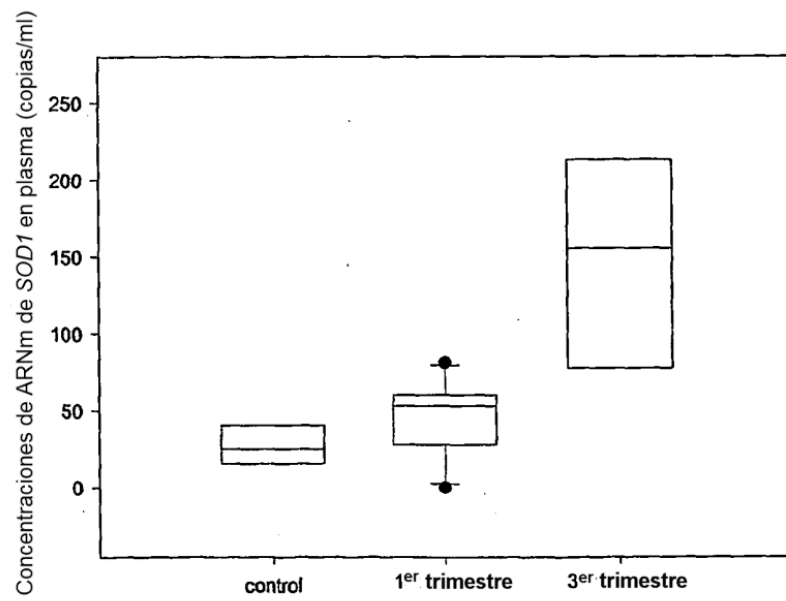
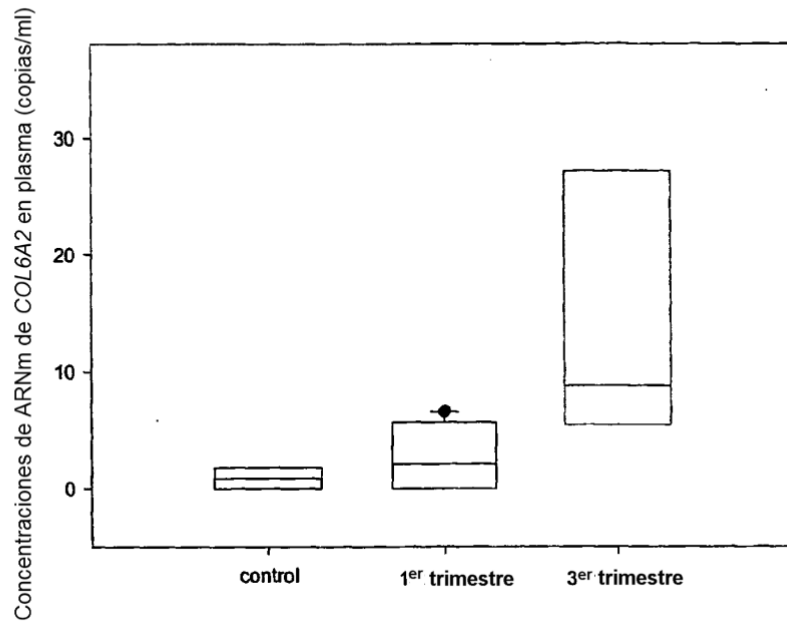


Figura 2

(C)



(D)

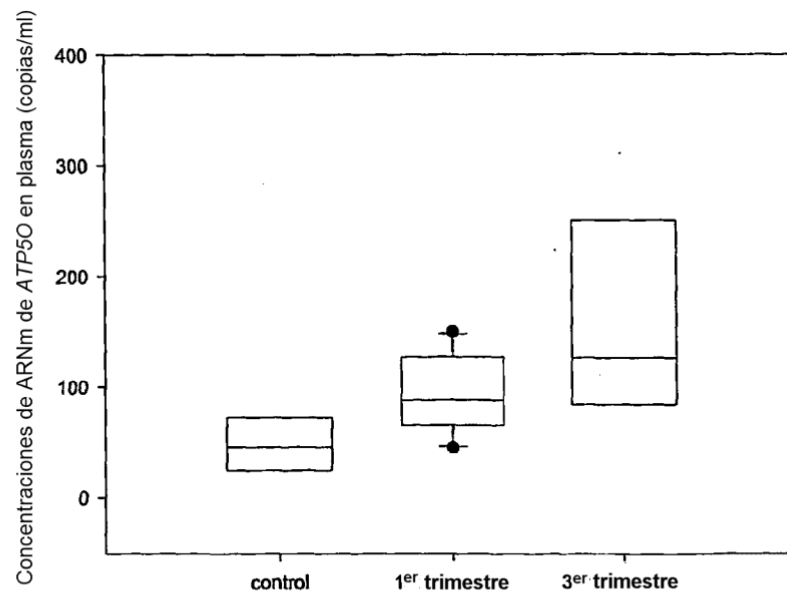
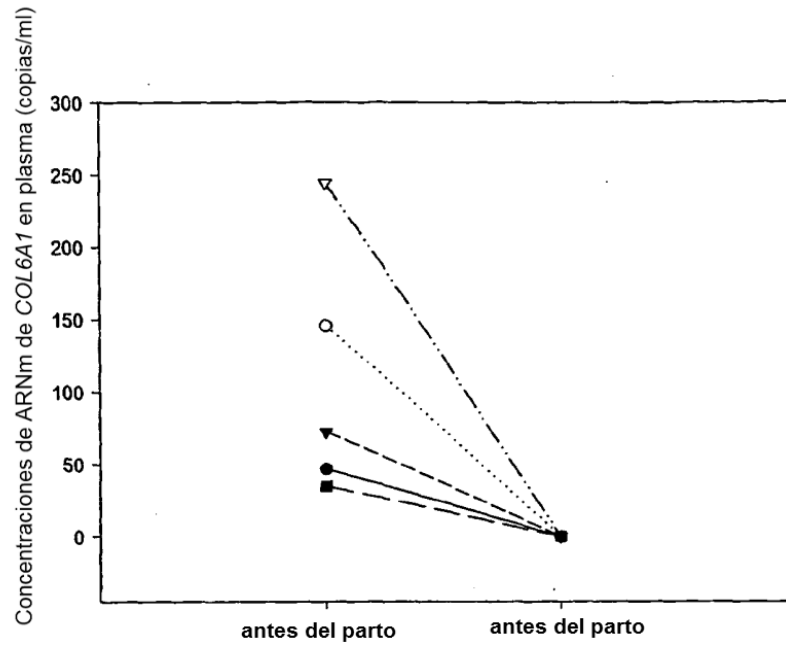


Figura 2

(A)



(B)

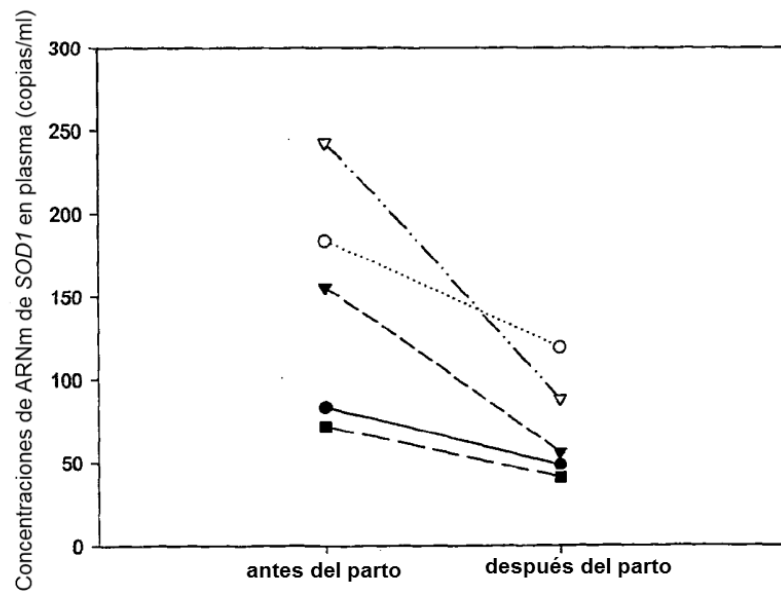
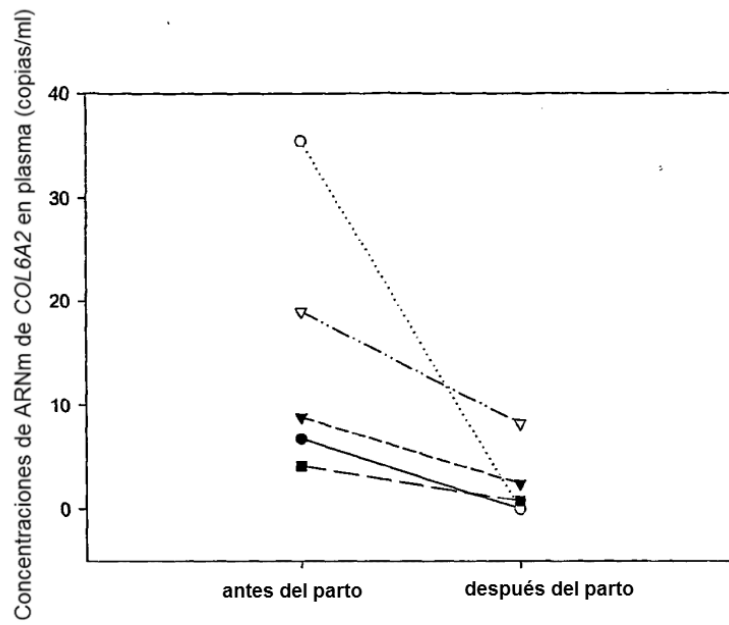


Figura 3

(C)



(D)

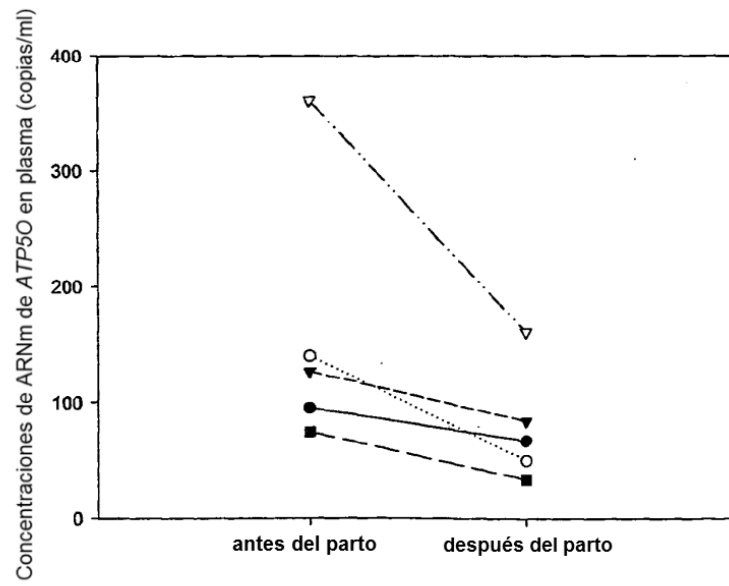


Figura 3

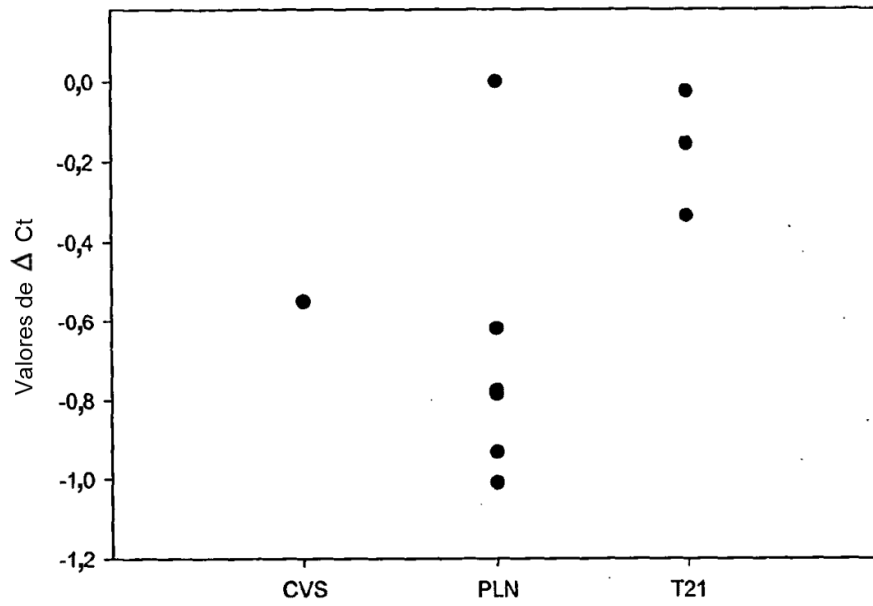
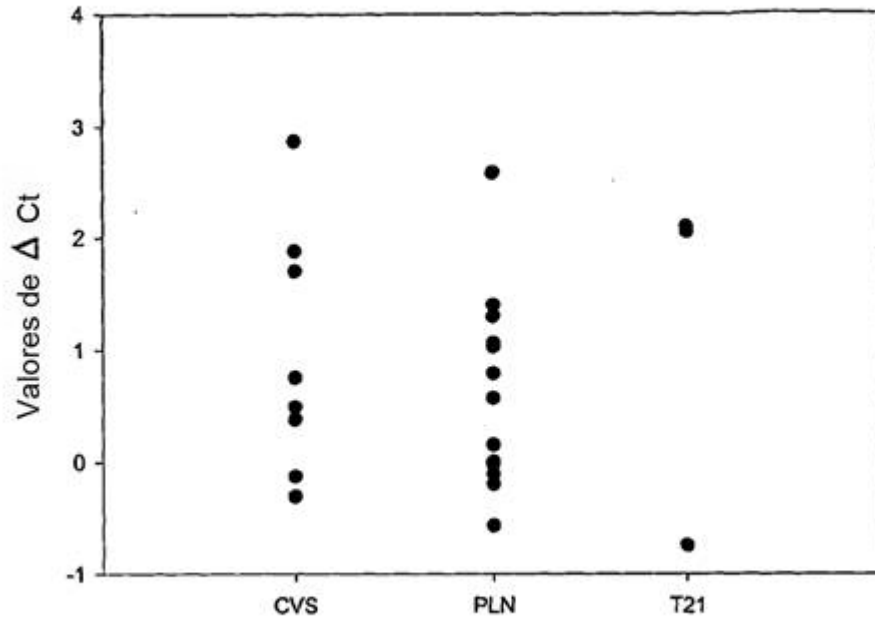


Figura 4



(A)



(B)

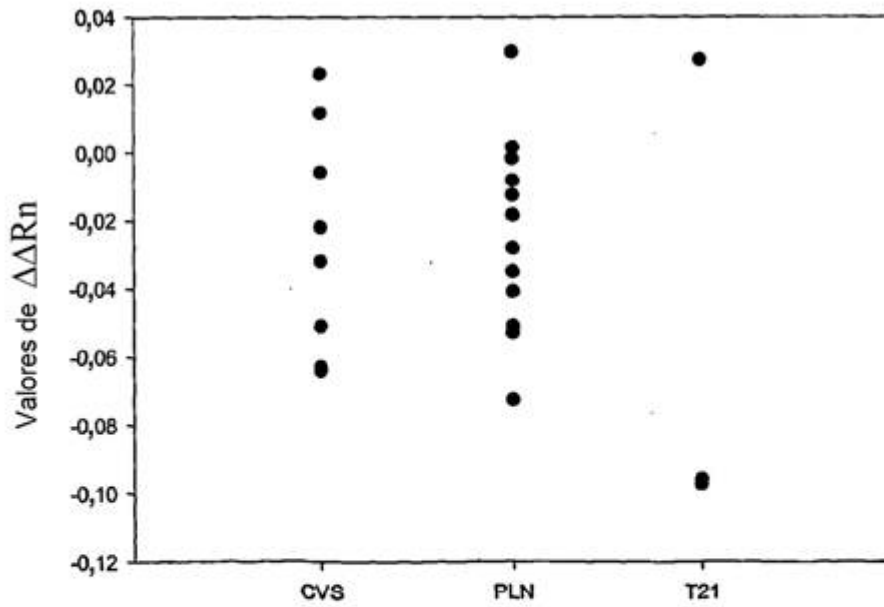
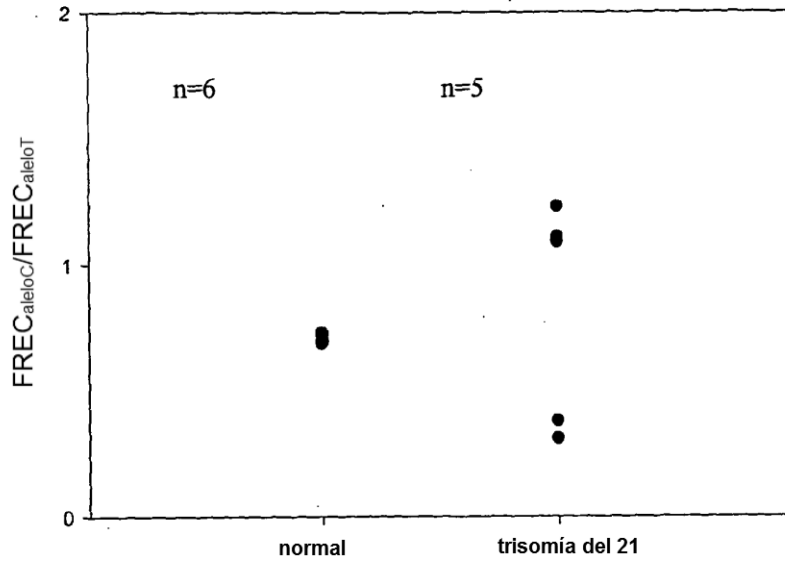


Figura 5

(A)



(B)

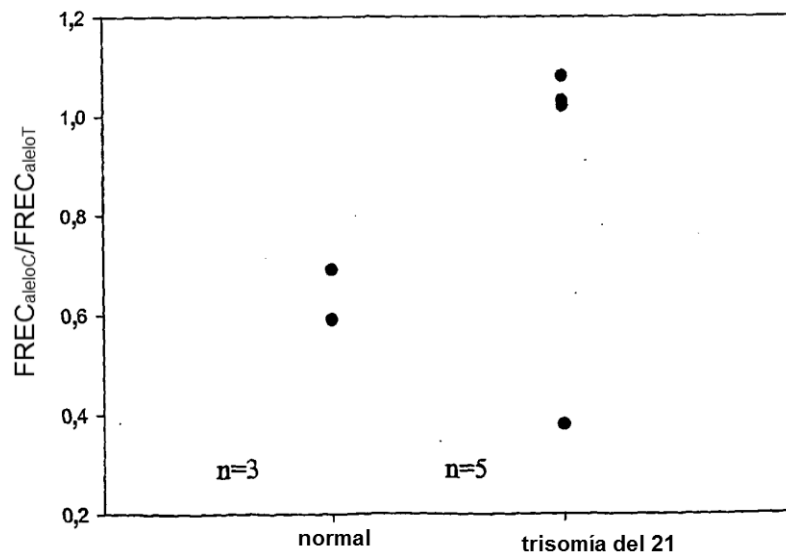
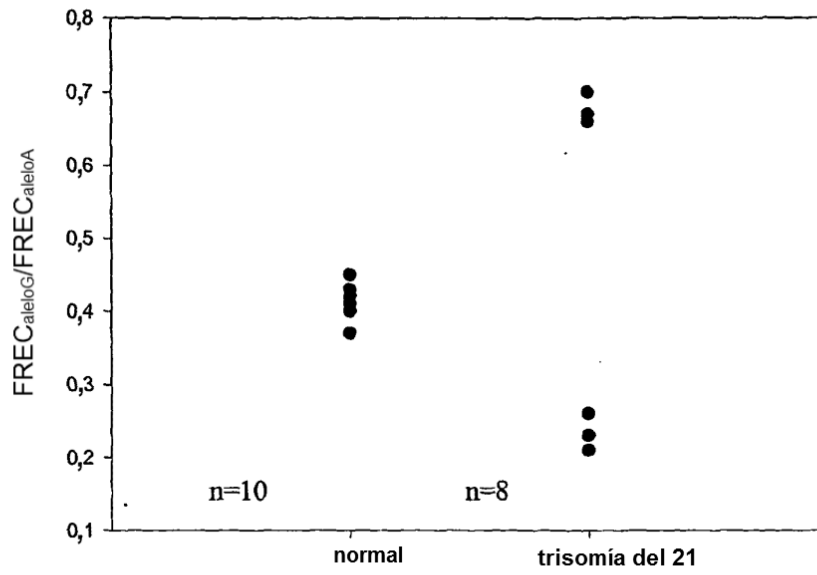


Figura 6

(A)



(B)

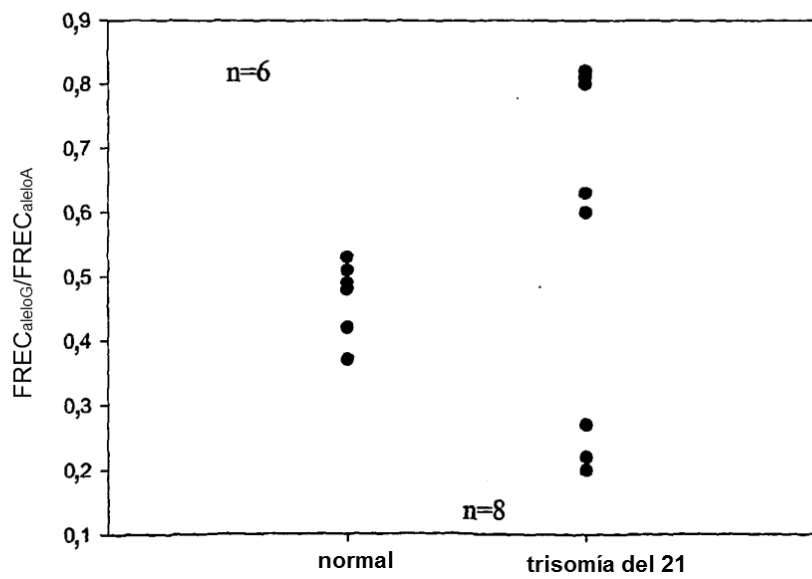


Figura 7

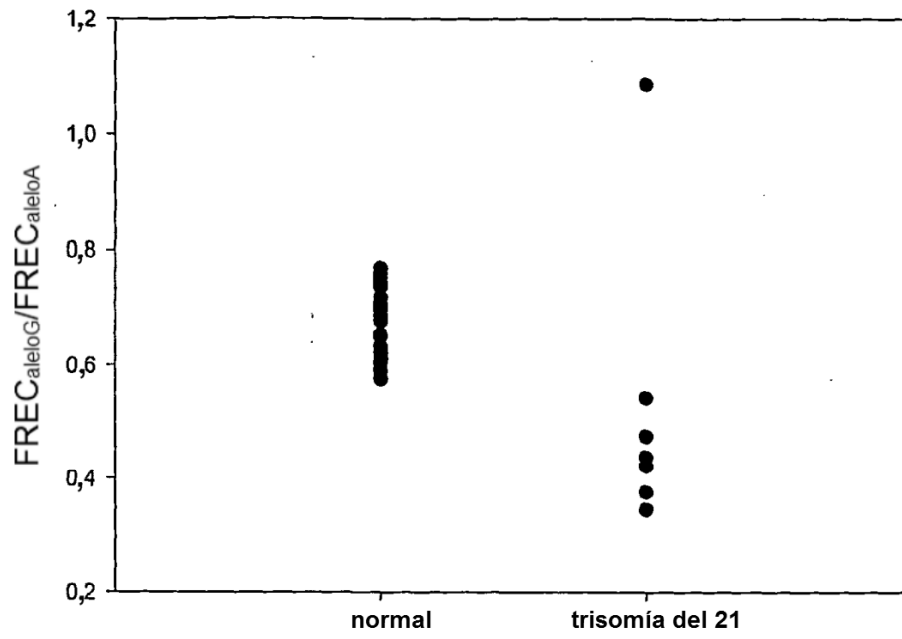


Figura 8

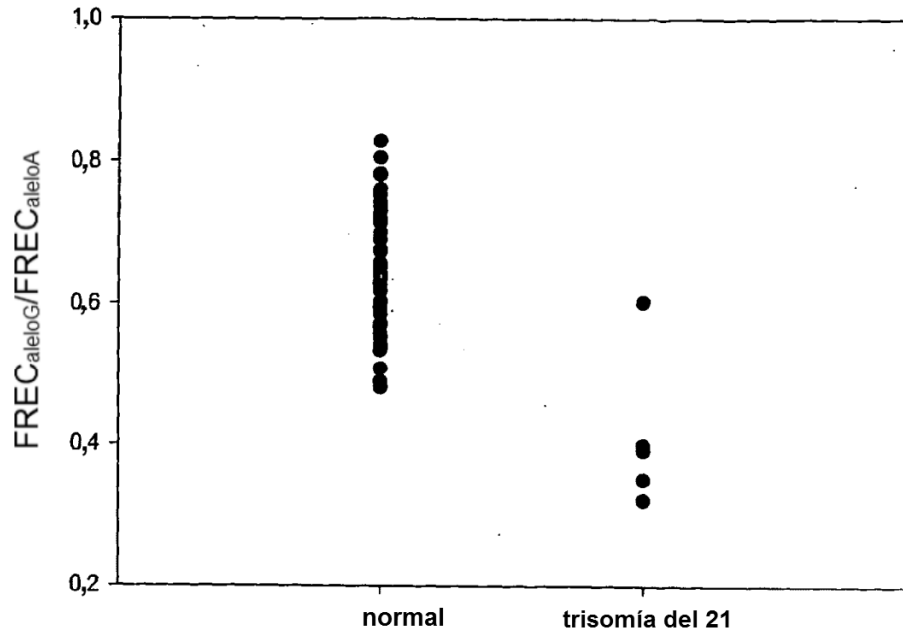


Figura 9

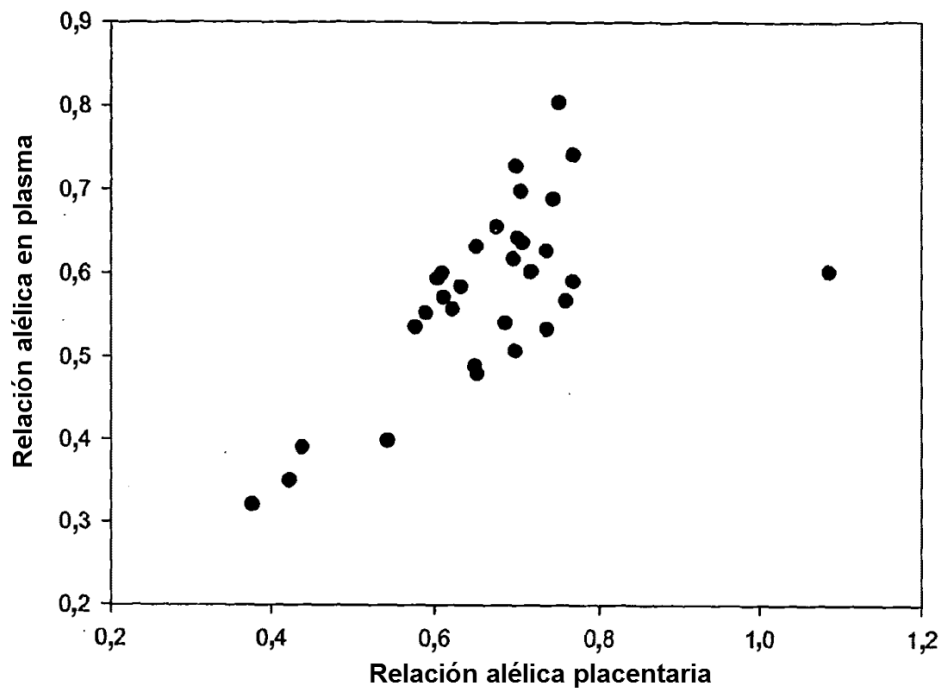


Figura 10

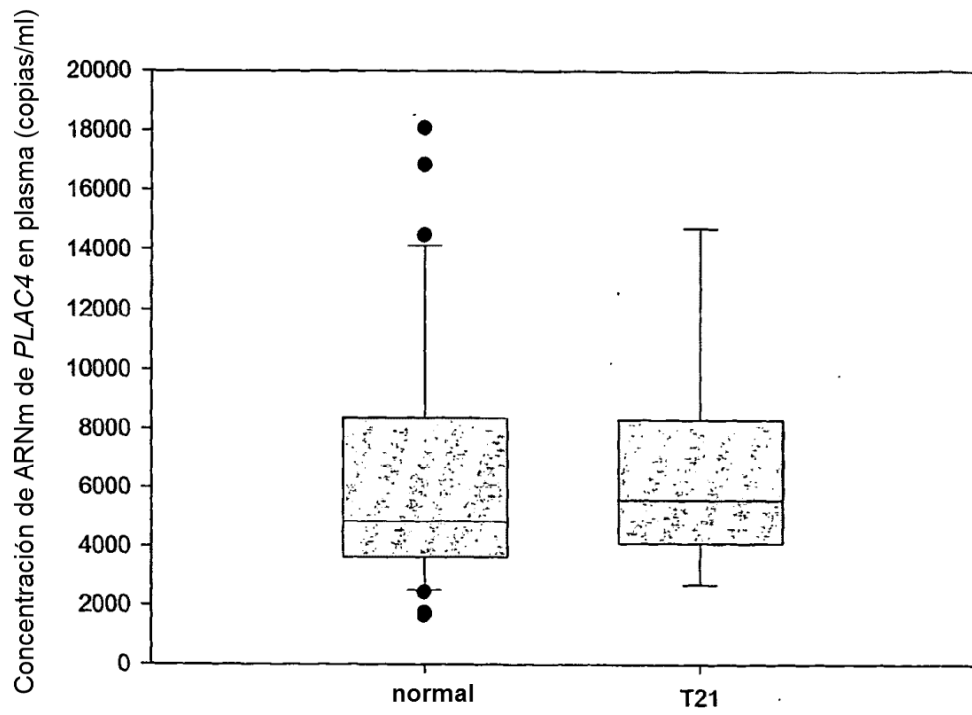


Figura 11

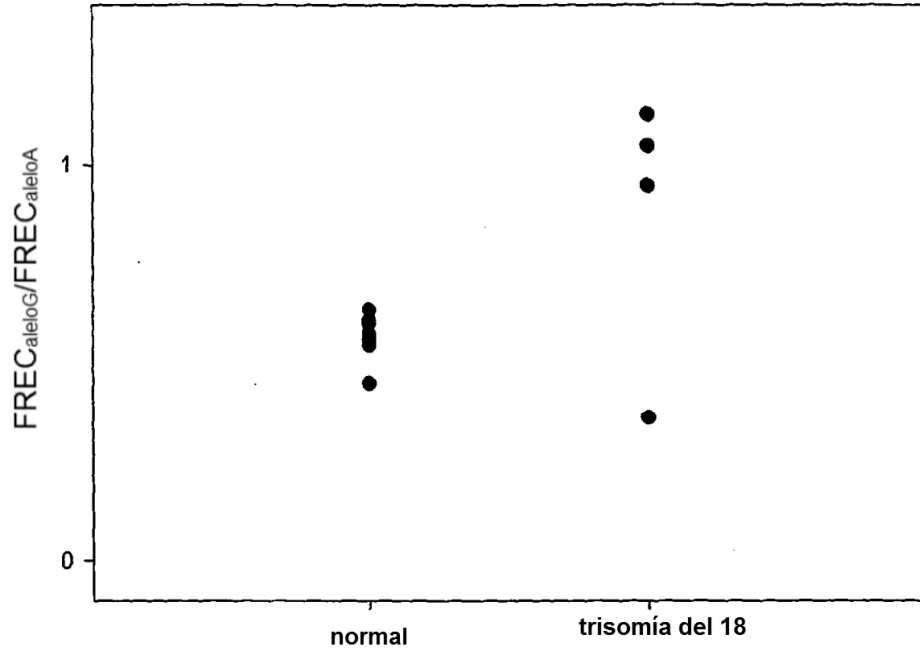


Figura 12



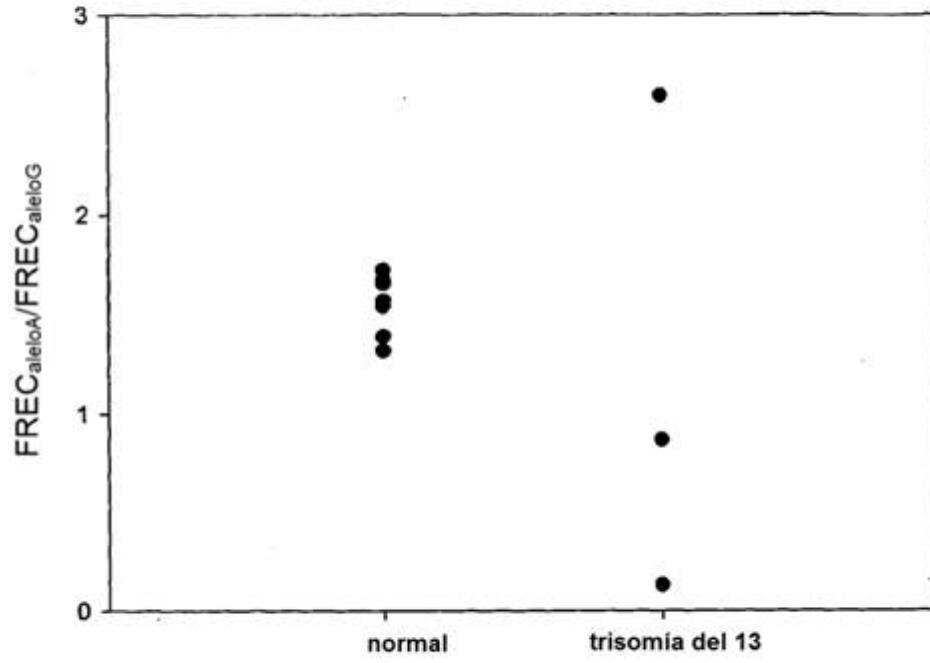


Figura 13

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

### Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 5075212 A [0063]

### Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

15

• HOMER, J. et al. *Prenat Diagn*, 2003, vol. 23, 566-571 [0001]

20

• MANN, K. *Methods Mol Med*, 2004, vol. 92, 141-156 [0001]

• ZIMMERMANN, B. et al. *Clin Chem*, 2002, vol. 48, 362-363 [0001]

• HU, D.G. et al. *Mol Hum Reprod*, 2004 [0001]

25

• CHITTY, L. *Br Med Bull*, 1998, vol. 54, 839-856 [0002]

• HOOK, E. B. *Lancet*, 1981, vol. 2, 169-172 [0002]

• NICOLAIDES, K. H. et al. *Prenat Diagn*, 2002, vol. 22, 308-315 [0002]

30

• WALD, N. J. et al. *Prenat Diagn*, 1997, vol. 17, 821-829 [0003]

• WALD, N. J. et al. *Lancet*, 2003, vol. 361, 835-836 [0003]

35

• WALD, N. J. et al. *N Engl J Med*, 1999, vol. 341, 461-467 [0003]

• WAPNER, R. et al. *N Engl J Med*, 2003, vol. 349, 1405-1413 [0003]

40

• LO, Y. M. D. et al. *Lancet*, 1997, vol. 350, 485-487 [0004]

• POON, L. L. M. et al. *Clin Chem*, 2000, vol. 46, 1832-1834 [0004]

45

• LO, Y. M. D. et al. *Clin Chem*, 1999, vol. 45, 1747-1751 [0004]

• ZHONG, X. Y. et al. *Prenat Diagn*, 2000, vol. 20, 795-798 [0004]

50

• NG, E. K. O. et al. *Clin Chem*, 2003, vol. 49, 727-731 [0004] [0005]

• NG, E. K. O. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, vol. 100, 4748-4753 [0004] [0005]

• TSUI, N. B. Y. et al. *J Med Genet*, 2004, vol. 41, 461-7 [0005]

• SAMBROOK ; RUSSELL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001 [0055] [0068]

• ROMERO ; ROTBART et al. *Diagnostic Molecular Biology Principles and Applications*. Mayo Foundation, 1993, 401-406 [0063]

• EGGER et al. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, 1442-1447 [0063]

• INNIS et al. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc, 1990 [0064]

• NOLTE. *Adv. Clin. Chem.*, 1998, vol. 33, 201-235 [0067]

• SINGER et al. *Biotechniques*, 1986, vol. 4, 230 [0070]

• HAASE et al. *Methods in Virology*, 1984, 189-226 [0070]

• WILKINSON. *In situ Hybridization*. IRL Press, Oxford University Press [0070]

• *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*. IRL Press, 1987 [0070]

• BEAUCAGE ; CARUTHERS. *Tetrahedron Letts.*, 1981, vol. 22, 1859-1862 [0072] [0086]

• NEEDHAM-VANDEVANTER et al. *Nucleic Acids Res.*, 1984, vol. 12, 6159-6168 [0072] [0086]

• PEARSON ; REGNIER. *J. Chrom.*, 1983, vol. 255, 137-149 [0072]

• PUSCH et al. *Pharmacogenomics*, 2002, vol. 3, 537-548 [0075]

• NG, E. K. O. et al. *Clin Chem*, 2002, vol. 48, 1212-1217 [0101]