

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 408**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2007 E 07763674 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1981995**

54 Título: **Examen genético fetal no invasivo mediante análisis digital**

30 Prioridad:

02.02.2006 US 764420 P

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

14.11.2013

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
1705 EL CAMINO REAL
PALO ALTO CA 94306-1106, US**

72 Inventor/es:

**QUAKE, STEPHEN y
FAN, HEI-MUN, CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 429 408 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

Examen genético fetal no invasivo mediante análisis digital

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/764.420 presentada el 2 de febrero de 2006.

Declaración de apoyo gubernamental

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno estadounidense. El gobierno estadounidense puede tener determinados derechos en esta invención.

Referencia a la lista de secuencias

10 Los solicitantes afirman que la copia en papel de la lista de secuencias es idéntica a la lista de secuencias en forma legible por ordenador que se encuentra en el disco de ordenador adjunto. Los solicitantes incorporan el contenido de la lista de secuencias como referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere al campo del examen genético fetal y al campo del análisis cuantitativo de ácidos nucleicos.

Técnica relacionada

20 Se reconoce ahora que se libera ADN fetal de la placenta y se mezcla con la sangre de la madre a niveles bastante altos, entre el 3% y el 6% del ADN en la sangre de la madre procede del feto. Esta observación se ha usado conjuntamente con ensayos de PCR para una variedad de exámenes genéticos fetales, género, Rh y talasemia. Sin embargo, la técnica sigue siendo limitada por dos motivos principales: en primer lugar, los ensayos de PCR sacrifican sensibilidad por especificidad, haciendo difícil identificar mutaciones particulares, y en segundo lugar, el trastorno genético más común, el síndrome de Down, es una trisomía cromosómica y por tanto no puede detectarse mediante PCR convencional en una muestra mixta.

25 Se ha encontrado ahora que estos problemas pueden solucionarse mediante el examen cuantitativo de grandes números de muestras de cromosomas a través del uso de técnicas altamente escalables. Este enfoque se denomina en el presente documento "análisis digital", e implica la separación del material genómico extraído en unidades diferenciadas de modo que la detección de una secuencia diana (por ejemplo, cromosoma 21) puede cuantificarse simplemente como binario (0,1) o múltiples sencillos, 2, 3, etc. El ejemplo principal de una técnica que puede usarse para producir tales resultados "digitales" es la "PCR digital", que permite una amplificación eficaz a partir de moléculas individuales, seguido por análisis cuantitativo posterior. La PCR digital, tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a una dilución cuantitativa, limitada de una muestra de ácido nucleico, tal como en placas de múltiples pocillos, luego la amplificación de una molécula de ácido nucleico en un pocillo, que debido a la dilución, debe ser o bien 0 o bien 1 molécula. La PCR digital usando placas de múltiples pocillos se ha usado anteriormente para detectar mutaciones poco comunes o bien mediante análisis en serie de amplicones de una molécula individual (es decir, clonal) (Vogelstein B, Kinzler KW. Proc Natl Acad Sci U S A. 3 de agosto de 1999; 96 (16): 9236-41) o bien mediante potenciación de la sensibilidad de la amplificación diferencial (<http://www.fluidigm.com/didIFC.htm>). Se describe a continuación una invención mediante la cual puede aplicarse PCR digital a diagnósticos fetales no invasivos con el fin de detectar mutaciones fetales con especificidad y sensibilidad más allá de los que es posible con análisis de PCR convencional.

40 Además, como también se describe en relación con la invención descrita a continuación, la PCR digital puede usarse para detectar aneuploidía, tal como la trisomía que provoca el síndrome de Down. Puesto que las aneuploidías no presentan un cambio mutacional en la secuencia, y son meramente un cambio en el número de cromosomas, no ha sido posible detectarlas en un feto sin recurrir a técnicas invasivas tales como amniocentesis o toma de muestras de vellosidades coriónicas (Science 309, 2 de septiembre de 2005 págs. 1476-8).

45 Otra forma de PCR digital se ha descrito como PCR en emulsión, que se ha usado para preparar pequeñas perlas con ADN amplificado de manera clonal (en esencia, cada perla contiene un amplicón de PCR digital). (Dressman *et al*, Proc Natl Acad Sci USA. 100, 8817 (22 de julio de 2003)).

50 Otra forma de PCR digital puede llevarse a cabo usando dispositivos microfluídicos. En esta realización, descrita a continuación, se diluye ADN y se separa en muestras pequeñas, diferenciadas para formar muestras de reacción mediante una serie canales y válvulas.

Un ejemplo de un método adecuado para el análisis de moléculas individuales que puede adaptarse a los presentes

métodos se facilita en Braslavsky *et al.*, "Sequence information can be obtained from single DNA molecules", Proc. Nat. Acad. Sci. 100(7): 3960-3964 (2003), que usa incorporación secuencial de nucleótidos marcados sobre un molde de ADN monocatenario inmovilizado y monitorización mediante microscopía de fluorescencia.

5 Otro aspecto de la técnica relevante implica la preparación de muestras con el fin de llevar a cabo los presentes procedimientos. Es decir, puede enriquecerse el ADN fetal en relación con el ADN materno. Chan, *et al.*, "Size Distribution of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma", Clin. Chem. 50(1): 88-92 (2004) notifican que las moléculas de ADN en plasma son principalmente fragmentos de ADN cortos. Los fragmentos de ADN en el plasma de mujeres embarazadas son significativamente más largos que los fragmentos de ADN de mujeres no embarazadas, y más largos que el ADN fetal.

10 Publicaciones y patentes relacionadas

Vogelstein *et al.*, "Digital Amplification", documento US 6.440.706, expedido el 27 de agosto de 2002, dan a conocer la identificación de mutaciones predefinidas que se espera que estén presentes en una fracción minoritaria de una población celular.

15 Lo, "Fetal DNA in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications", Clin. Chem. 46:1903-1906 (2000) da a conocer la demostración de ADN fetal en plasma materno. Los autores encontraron un nivel fraccional medio del 3,4% de ADN fetal en ADN materno en el plasma durante el embarazo temprano. Los autores notifican la detección del gen RhD y polimorfismos de microsátélites en el plasma de mujeres embarazadas.

20 Li *et al.*, "Detection of Paternally Inherited Fetal Point Mutations for β -Thalassemia Using Size Fractionated Cell-Free DNA in Maternal Plasma", J. Amer. Med. Assoc. 293:843-849 (16 de febrero de 2005) dan a conocer que el análisis de ADN fetal libre de células en plasma materno ha demostrado ser notablemente fiable para la evaluación de loci fetales ausentes del genoma materno, tales como secuencias específicas del cromosoma Y o el gen RhD en mujeres embarazadas que son negativas para Rh. Los autores notifican la extracción y el fraccionamiento por tamaño de ADN de plasma materno usando electroforesis en gel de agarosa. Entonces, se usaron ácidos nucleicos peptídicos (PNA) para unirse específicamente a un alelo materno para suprimir la amplificación por PCR del alelo materno de tipo natural, enriqueciendo de ese modo la presencia de secuencias mutantes heredadas por vía paterna. Se examinaron cuatro mutaciones puntuales distintas en el gen de β -globina. Se encontró que la etapa de PNA era necesaria para la detección de alelos mutantes usando PCR específica de alelo.

30 Lo *et al.*, "Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis", Am. J. Hum. Genet. 62:768-775 (1998) dan a conocer un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real para medir la concentración de ADN fetal en suero y plasma materno. Los autores encontraron una media de 25,4 equivalentes de genoma/ml de ADN fetal en embarazo temprano. Esto corresponde a aproximadamente el 3,4% del ADN total en embarazo temprano.

35 Chan *et al.*, "Size Distribution of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma", Clin Chem. 50:89-92 (enero de 2004) investigaron la distribución de tamaño de ADN en plasma en mujeres no embarazadas y mujeres embarazadas, usando un panel de ensayos de PCR cuantitativa con diferentes tamaños de amplicones que seleccionan como diana el gen *leptina*. Encontraron que los fragmentos de ADN en el plasma de mujeres embarazadas son significativamente más largos que aquellos en el plasma de mujeres no embarazadas, y las moléculas de ADN derivadas de la madre son más largas que las derivadas del feto.

40 Tufan *et al.*, "Analysis of Cell-Free Fetal DNA from Maternal Plasma and Serum Using a Convencional Multiplex PCR: Factors Influencing Success", Turk. J. Med Sci. 35: 85-92 (2005) compararon las tasas de éxito de dos técnicas de extracción de ADN diferentes, el método directo basado en calor y el método de minikit de sangre de ADN QIAMP. También se notificó el papel crucial de la optimización de la PCR. Los autores usaron el marcador DYS 14 para el cromosoma Y y el gen de GAPH para un control. Se encontró que el minikit de QIAMP daba los mejores resultados en análisis de determinación del sexo usando PCR múltiple y tinción con bromuro de etidio en geles.

45 Hromadnikova *et al.*, "Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down Syndrome pregnancies", BMC Pregnancy and Childbirth 2(4): 1-5 (2002), investigaron los niveles de ADN total en plasma materno y no encontraron ninguna diferencia en los niveles de ADN fetal entre las pacientes que portaban fetos con síndrome de Down y los controles. Se realizó análisis de PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores para el gen de β -globina y el locus SRY.

50 Grundevikk y Rosen, "Molecular Diagnosis of Aneuploidies", publicado en línea en <http://www.molbiotech.chalmers.se/research/mk/mbtk/Molecular%20diagnostics%20of%20aneuploidies%20-%20rapport.pdf>, sugieren que pueden llevarse a cabo métodos para la detección de aneuploidías (tales como síndrome de Down, síndrome de Edwards o cromosomas sexuales extra) en células nucleadas fetales aisladas de sangre materna. En esta revisión, los autores también describen una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF-PCR), basada en la amplificación de repeticiones en tándem cortas específicas para el cromosoma que va a someterse a prueba. Describen pruebas en las que se amplificó ADN a partir de muestras de vellosidades coriónicas o amnióticas. Los autores sugieren que los marcadores STR proporcionarán productos de

5 PCR de diferente tamaño, y estas diferencias de tamaño pueden estudiarse analizando los tamaños de picos en la electroforesis. También se propone que puede usarse PCR en tiempo real cuantitativa para diagnosticar el síndrome de Down comparando la cantidad de un gen ubicado en el cromosoma 12 con la cantidad de un gen ubicado en otro cromosoma autosómico. Si la razón de estos dos genes es de 1:1, el feto es normal, pero si la razón de estos genes es de 3:2, indica síndrome de Down. Los autores proponen el uso del marcador de síndrome de Down *DSCR3*. También sugieren que puede usarse como referencia el gen de mantenimiento *GAPDH* en el cromosoma 12.

10 Poon *et al.*, "Diferenteial DNA Metilation between Fetus and Mother as a Strategy for Detecting Fetal DNA in Maternal Plasma", Clin. Chem. 48(1): 35-41 dan a conocer la detección de genes o mutaciones en un feto en el que también está presente la misma mutación o estado en ADN materno. Es decir, el uso de ADN fetal en plasma materno está limitado debido a la baja cantidad de ADN fetal en comparación con ADN materno. Los autores superan esta limitación detectando el locus *IGF2-H19*, que se mantiene en un estado de ADN metilado en el alelo paterno y está no metilado en el alelo materno. Los autores utilizaron un kit de modificación con bisulfito mediante el cual se convierten residuos de citosina no metilados en uracilo. Las diferencias de secuencia entre secuencias de ADN metilado y no metilado podían distinguirse con cebadores de PCR diferentes. Se usó ADN extraído de la capa leucocítica.

15 Science 309:1476 (2 de septiembre de 2005) News Focus "An Earlier Look at Baby's Genes" describe intentos por desarrollar pruebas para detectar el síndrome de Down usando sangre materna. Los intentos tempranos por detectar síndrome de Down usando células fetales a partir de sangre materna se consideraron "sólo modestamente esperanzadores". El informe también describe el trabajo de Dennis Lo para detectar el gen Rh en un feto cuando está ausente en la madre. Según se informa, también se han detectado otras mutaciones que pasaron del padre, tales como fibrosis quística, beta-talasemia, un tipo de enanismo y enfermedad de Huntington. Sin embargo, estos resultados no siempre han sido reproducibles.

20 La solicitud de patente estadounidense 20040137470 concedida a Dhallan, Ravinder S, publicada el 15 de julio de 2004, titulada "Métodos para la detección de trastornos genéticos" (*Methods for detection of genetic disorders*), describe un método para detectar trastornos genéticos usando PCR de ADN molde conocido y análisis de restricción. También describe un procedimiento de enriquecimiento para ADN fetal. También describe un método usado para detectar mutaciones, y anomalías cromosómicas incluyendo pero sin limitarse a translocación, transversión, monosomía, trisomía y otras aneuploidías, deleción, adición, amplificación, redistribución y translocación de fragmentos. Pueden detectarse numerosas anomalías simultáneamente. Se dice que el método proporciona un método no invasivo para determinar la secuencia de ADN fetal a partir de un tejido, tal como sangre, extraído de una mujer embarazada, y un método para aislar ácido nucleico libre a partir de una muestra que contiene ácido nucleico.

Breve resumen de la invención

35 El siguiente resumen breve no pretende incluir todas las características y aspectos de la presente invención, ni implica que la invención debe incluir todas características y aspectos comentados en este resumen.

40 En resumen, la presente invención se refiere a un método según la reivindicación 1 en el presente documento. Se obtiene tejido materno que contiene material genético tanto materno como fetal. Preferiblemente, el tejido materno es plasma sanguíneo o sangre periférica materna. El término "plasma" puede incluir plasma o suero. El material genético puede ser ARN o ADN genómico, preferiblemente ARNm. En el caso de ARNm, pueden elegirse secuencias diana correspondientes a genes que se expresan altamente en la placenta para detectar el material genético fetal. El material genético (por ejemplo, ADN) en cada muestra de reacción se detecta con un reactante específico de secuencia dirigido a al menos una de dos secuencias diana en el material genético para obtener un producto de reacción detectable si la secuencia diana está presente en la muestra de reacción. Por ejemplo, una sonda específica para el cromosoma 21 se une a la muestra de reacción, junto con una sonda control específica para otro cromosoma. En la mayoría de los casos, los resultados serán a partir de ADN materno, pero un pequeño número de resultados se obtendrán a partir de ADN fetal. Con el fin de distinguir la variación aleatoria de los resultados fetales, se ejecutan un gran número de reacciones, y se aplican métodos estadísticos a los resultados. El marcaje y la detección en el presente método se usan para distinguir la presencia o ausencia de una secuencia diana individual, denominado "análisis digital", aunque puede realizarse con métodos de detección de ácidos nucleicos sensibles que distinguen entre una y más de una secuencia diana en una muestra diferenciada. Muchas técnicas de fluorescencia tienen esta sensibilidad. Las secuencias diana se eligen de modo que pueden distinguirse una secuencia materna y una secuencia fetal, tal como dos copias de una secuencia materna frente a dos copias de una secuencia fetal.

55 El material genético así obtenido se distribuye en muestras diferenciadas, en las que cada muestra contendrá, en promedio, no más de aproximadamente una secuencia diana por muestra. El promedio de una secuencia diana significa que, por motivos prácticos, la muestra contendrá preferiblemente de 0,1 a 0,8 equivalentes de genoma por muestra diferenciada, idealmente 0,5 equivalentes de genoma por muestra. El método puede realizarse con diluciones mediante lo cual se detectan más secuencias diana en muestras que contienen un número de copias trisómico o aumentado de la secuencia diana. Es decir, si se está analizando el cromosoma 21, la mezcla puede diluirse de manera que, en promedio, pueden detectarse dos cromosomas presentes en un ADN materno, y tres

5 cromosomas en un ADN fetal con síndrome de Down. Alternativamente, el método puede realizarse con diluciones mediante lo cual más muestras de reacción son positivas en esta situación. Se detecta la presencia o ausencia de diferentes secuencias diana en las muestras diferenciadas; y los resultados se analizan mediante lo cual el número de resultados a partir de las muestras diferenciadas proporcionará datos suficientes para obtener resultados que distinguen diferentes secuencias diana. En un aspecto, el método implica un análisis de una trisomía. En este método, una de las diferentes secuencias diana (por ejemplo el cromosoma 21) es diploide en el material genético materno y aneuploide en el material genético fetal y otra de las diferentes secuencias diana (por ejemplo el cromosoma 12) es diploide en el material genético tanto materno como fetal.

10 Las muestras diferenciadas están en muestras de reacción en las que pueden analizarse las secuencias diana. Las muestras de reacción pueden ser, por ejemplo, pocillos en una placa de microtitulación, fases acuosas en una emulsión, zonas en una superficie de matriz o cámaras de reacción en un dispositivo microfluídico. Las muestras de reacción pueden usarse para el análisis por PCR de las muestras diferenciadas. Las muestras diferenciadas se ponen en contacto con una pluralidad de cebadores de PCR, incluyendo al menos un cebador (o uno directo y uno inverso) dirigido específicamente a una secuencia de control materna, que se espera que sea igual tanto en la madre como en el feto. También se dirigen específicamente cebadores de PCR a una secuencia fetal, es decir, una que puede estar presente tanto en la madre como en el feto, pero que está amplificada o alterada en el feto. La amplificación por PCR permitirá la detección de estas dos secuencias diferentes y, según el presente método, habrá una diferencia en el caso de una secuencia diana fetal anómala. El método de PCR puede ser (pero no necesariamente) cuantitativo. Puede usarse PCR en tiempo real cuantitativa, que incluye la hibridación de secuencias diana con un ácido nucleico que tiene un marcador fluorescente. También puede usarse una sonda fluorescente que se hibrida con la secuencia diana. Se conocen para este fin varios protocolos de "PCR digital", así como PCR en emulsión o basada en perlas. Aunque están fácilmente disponibles sondas fluorescentes y pueden usarse para proporcionar resultados sensibles, por ejemplo, en combinaciones de FRET, pueden usarse otras técnicas de marcaje.

25 El número de muestras diferenciadas se elige según los resultados deseados. En un aspecto, se prefiere que se obtenga un alto grado de significación estadística, y el número de muestras es de al menos aproximadamente 10.000. Con el fin de mejorar la confianza estadística, es preferible emplear grandes números de reacciones, preferiblemente entre 500 y 100.000, más preferiblemente entre 10.000 y 100.000 o más reacciones, dependiendo del porcentaje de ADN fetal presente en la mezcla. Los resultados que van a obtenerse deben ser estadísticamente significativos para los fines del análisis realizado, por ejemplo examen inicial, diagnóstico primario, etc. Una medida comúnmente usada de significación estadística cuando se desea un resultado altamente significativo es $p < 0,01$, es decir, un intervalo de confianza del 99% basado en una prueba de la t o chi-cuadrado.

30 Sin embargo, tal como se muestra a continuación, pueden obtenerse resultados con menos muestras, por ejemplo del orden de aproximadamente 500 muestras, colocadas en muestras de reacción separadas. Pueden analizarse menos muestras diferenciadas cuando el material genético está presente en una concentración superior en la mezcla. La mezcla puede enriquecerse en material genético fetal. Un método para enriquecer ADN plasmático en ADN fetal es la separación por tamaño, mediante lo cual se usa una preparación que comprende sólo fragmentos de ADN inferiores a aproximadamente 300 pb para medir secuencias diana.

40 Puede detectarse una variedad de anomalías genéticas según el presente método, incluyendo alteraciones conocidas en uno o más de los genes: CFTR, factor VIII (gen F8), beta globina, hemocromatosis, G6PD, neurofibromatosis, GAPDH, beta amiloide y piruvato cinasa. Las secuencias y mutaciones comunes de estos genes se conocen. Pueden detectarse otras anomalías genéticas, tales como las que implican una secuencia que se deletorea en un cromosoma humano, se mueve en una translocación o inversión, o se duplica en una duplicación cromosómica, en las que dicha secuencia se caracteriza en un trastorno genético conocido porque el material genético fetal no está presente en el material genético materno. Por ejemplo, las trisomías cromosómicas pueden incluir parcial, en mosaico, en anillo, 18, 14, 13, 8, 6, 4 etc. Puede encontrarse una lista de las anomalías en el mapa mórbido de OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmorbid.cgi>.

En general, el término "aneuploidía" se usa para referirse a la aparición de uno o más cromosomas extras o que faltan.

50 En un aspecto, el presente método de detección diferencial de secuencias diana puede implicar secuenciación directa de secuencias diana del material genético. La secuenciación de una única molécula, tal como se conoce, se describe adicionalmente a continuación. El método también puede comprender la secuenciación de derivados amplificados de los amplicones o clones de secuencias diana del material genético. Es decir, una secuencia diana en una muestra diferenciada se amplifica mediante PCR, es decir, como un amplicón, o se clona en un vector que se hace crecer y de ese modo se amplifica obteniendo múltiples copias del inserto de vector.

60 También se describen materiales seleccionados y combinados para llevar a cabo los presentes métodos. Por tanto, se proporciona un kit para la detección diferencial de secuencias diana en ADN materno y fetal en una muestra de ADN mixto, que comprende cebadores específicos para una secuencia genéticamente anómala y una secuencia control, tal como dos cromosomas, uno de los cuales es posiblemente aneuploide y uno de los cuales es presumiblemente diploide; un tampón de reacción de PCR para formar una muestra de reacción de PCR con los

5 cebadores en un dispositivo que tiene muestras de reacción separadas; y un medio de separación por tamaño para separar la muestra de ADN en una fracción que tiene menos de aproximadamente 1000 pb. El medio de separación por tamaño puede ser gel o material de centrifugación para recuperar fragmentos de ADN más pequeños y por tanto enriquecer ADN fetal. El kit puede comprender además un par de cebadores específicos para el cromosoma 21. El kit puede comprender además el dispositivo que tiene muestras de reacción separadas para muestras diferenciadas. El dispositivo puede ser un dispositivo microfluídico o una placa de microtitulación que tiene al menos 1.000 muestras de reacción diferenciadas.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es una ilustración esquemática del presente método analítico, que muestra la distribución de material genético en compartimentos (1A), picos de cromosomas de diferente altura (1B) y el análisis estadístico de cromosomas (1 C);

la figura 2 es una fotografía de un chip microfluídico que tiene 12 paneles (numerados 1-12) que contienen ADN con cromosoma 21 marcado;

15 la figura 3 es una fotografía de un chip microfluídico que tiene 12 paneles (numerados 1-12) que contienen ADN con cromosoma 12 marcado; y

la figura 4 es un gráfico que muestra resultados de experimentos realizados usando análisis digital de ADN normal y trisómico mixto (síndrome de Down, trisomía del cromosoma 21).

Descripción detallada de la realización preferida

Esquema

20 I. Visión general

II. Descripción de las etapas

A. Preparación del tejido

B. Distribución de moléculas de ADN

C. Detección y cuantificación

25 1. Métodos de PCR digital

2. PCR en emulsión de perlas

3. Dilución microfluídica con PCR

4. Detección y/o secuenciación de moléculas individuales

D. Evaluación cuantitativa

30 III. Aplicaciones específicas

A. Preparación para detectar trisomía con análisis de frecuencia.

B Protocolo de muestras

IV. Ejemplos

I. Visión general

35 Los métodos y materiales descritos a continuación se aplican a técnicas para analizar numerosos ácidos nucleicos contenidos en una muestra de tejido (preferiblemente suero o, más preferiblemente, plasma) que contiene una mezcla de ADN tanto de la madre como del feto y que permite la detección de diferencias pequeñas pero estadísticamente significativas.

40 La presente invención implica el análisis de sangre materna para detectar un estado genético, en el que se analiza el ADN fetal y materno mixto en la sangre materna para distinguir una mutación fetal o anomalía genética del antecedente del ADN materno. Se ha encontrado que, usando una combinación de etapas, puede analizarse una muestra de ADN que contiene ADN de tanto la madre como el feto para distinguir un estado genético presente en una fracción minoritaria del ADN, que representa el ADN fetal. El método emplea "análisis digital", en el que el ADN en la muestra se aísla hasta una molécula diana individual nominal en un volumen de reacción pequeño. Cada mezcla de muestras tiene una posibilidad de tener distribuida en la misma menos de 1 diana (es decir, 0 dianas) o más de una diana. A continuación, se detectan las moléculas diana en cada pocillo de reacción, preferiblemente

como secuencias diana que se amplifican, lo que puede incluir una cuantización del número de copias de partida de la secuencia diana, es decir, 0, 1, 2, 3, etc. Se usa una secuencia de control para distinguir un aumento anómalo en la secuencia diana, por ejemplo, una trisomía. Por tanto, hay una detección diferencial de secuencias diana, una de las cuales se elige para representar un genotipo normal presente en tanto la madre como la descendencia, y una de las cuales se elige para la detección de un genotipo anómalo en la descendencia, en la que la secuencia diana en la descendencia será diferente de la de la madre, por ejemplo, en trisomía.

La figura 1A ilustra una realización en la que se usa detección cuantitativa, por ejemplo PCR en tiempo real cuantitativa. Se procesa sangre 10 para obtener ADN 12 plasmático, que se diluye y se distribuye en alícuotas 14. Éstas se añaden a pocillos de 1A a 5D de reacciones. Se muestran en los pocillos dianas que representan los cromosomas 21 y 22. En el pocillo 2A, no se encuentra ADN diana; algunos pocillos (no mostrado) pueden tener ADN en exceso. En el pocillo 3B, se encuentra ADN fetal que tiene trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down). El resto de los pocillos contienen ADN materno. El ADN se amplifica y/o se marca y se obtiene una lectura cuantitativa, tal como se muestra en 16. El pico 18 que representa al pocillo 3B será un 50% más alto que los picos de los otros pocillos, o los picos de una secuencia de referencia en el cromosoma 22. El pocillo A2, que carece de o bien 21 o bien 22, no tendrá ningún pico. Se muestran los picos en 20. Una única ejecución tendrá numerosas variaciones aleatorias, tales como pocillos que no tienen ninguna secuencia diana, o que tienen duplicación a través de variabilidad de la muestra. Además, muestras sin diana darán como resultado claramente ningún pico en absoluto; pocillos con dos o más dianas darán picos significativamente más altos que el pico 18, es decir, 2X o 2,5 X los controles. Estos resultados se distinguen ejecutando una multitud de reacciones, seguido por análisis estadístico que puede diferenciar variaciones aleatorias de resultados verdaderos.

La figura 1C ilustra una realización en la que el ADN se distribuye en un modo más diluido (menos de 1, o aproximadamente medio equivalente de genoma por pocillo). En este caso, marcadores del cromosoma 21 (cebadores) generarán más positivos que marcadores específicos (por ejemplo, cebadores) para el cromosoma 22 (un cromosoma diploide) debido simplemente a la abundancia ligeramente mayor del cromosoma 21 en una muestra que contiene trisomía. Tal como se muestra, algunos pocillos contendrán positivos 20 para ambos cromosomas, algunos contendrán negativos 22 para ambos cromosomas, pero algunos contendrán blancos 24 para el cromosoma diploide y picos para el cromosoma trisómico, debido a su mayor abundancia. Los datos de un pico más alto 18 no se usan en este modo. Tal como se explica a continuación, esta ligera diferencia puede hacerse estadísticamente significativa examinando un gran número de pocillos, y mediante la sensibilidad del presente método para una molécula individual.

Por tanto, el presente método comprende generalmente las siguientes etapas:

1. Obtener un tejido que contiene ADN de un sujeto en estado de gestación, ADN que se sabe que tiene aproximadamente un 3% de ADN fetal. Este material es preferiblemente sangre extraída, y el ADN circulante se encuentra en el plasma sanguíneo, en vez de en células. La sangre o el plasma puede enriquecerse opcionalmente en ADN fetal mediante métodos conocidos, tales como fraccionamiento por tamaño para seleccionar fragmentos de ADN inferiores a aproximadamente 300 pb. Alternativamente, puede excluirse el ADN materno, que tiende a ser más grande de aproximadamente 500 pb. Otra etapa de enriquecimiento puede ser tratar la muestra de sangre con formaldehído, tal como se describe en Dhallan *et al.* "Methods to Increase the Percentage of Free Fetal DNA Recovered From the Maternal Circulation", J.Am. Med. Soc. 291 (9): 1114-1119 (marzo de 2004).

2. Distribuir moléculas de ADN individuales de esta muestra en varias muestras de reacción diferenciadas, en el que el número de muestras de reacción se selecciona para dar un resultado estadísticamente significativo para el número de copias de una diana en las moléculas de ADN. Además, la muestra de reacción está confinada en un volumen pequeño para llevar las moléculas de reacción a aproximación estrecha. La cantidad de molécula de ADN por muestra de reacción es preferiblemente del orden de una copia del cromosoma de interés equivalente por muestra de reacción.

3. Detectar la presencia de la diana en el ADN en un gran número de muestras de reacción, preferiblemente con una técnica específica de secuencia tal como secuenciación de lectura corta altamente multiplexada o una reacción PCR en la que el producto de PCR está marcado para dar una lectura cuantitativa conveniente. La etapa de detección se denomina en el presente documento "PCR digital" y puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos, tales como (a) mediante PCR sobre muestras diluidas en pocillos individuales de una placa de microtitulación; (b) PCR sobre muestras diluidas en emulsiones que contienen cebadores inmovilizados en perlas; o (c) PCR sobre muestras atrapadas en una cámara microfluídica; y

4. Análisis cuantitativo de la detección de las secuencias diana maternas y fetales. En algunos casos esto puede incluir dianas para diferentes regiones, tales como sondas para una diana en un cromosoma que se sospecha que está presente en un número de copias anómalo (trisomía) en comparación con un cromosoma diploide normal, que se usa como control.

II. Descripción de las etapas

A. Preparación del tejido

El presente método se refiere a pruebas no invasivas. El material de partida preferido es sangre venosa periférica materna. Con el fin de obtener ADN suficiente para las pruebas, se prefiere que se extraigan 10-20 ml de sangre, con el fin de obtener aproximadamente al menos 10.000 equivalentes de genoma de ADN total. Este tamaño de muestra se basa en una estimación de que está presente ADN fetal como aproximadamente 25 equivalentes de genoma/ml de plasma materno en embarazo temprano, y una concentración de ADN fetal de aproximadamente el 3,4% de ADN plasmático total. Sin embargo, puede extraerse menos sangre para un examen genético cuando se requiere menos significación estadística, o la muestra de ADN está enriquecida en ADN fetal.

Debe indicarse que, aunque la presente descripción se refiere todo el tiempo a ADN, también puede analizarse el ARN fetal que se encuentra en la sangre materna. Tal como se describe en Ng *et al.*, "mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma", Proc. Nat. Acad. Sci. 100(8): 4748-4753 (2003), pudieron detectarse transcritos de ARNm de hPL (lactógeno placentario humano) y hCG (gonadotropina coriónica humana) en plasma materno, tal como se analizó usando los respectivos ensayos de RT-PCR en tiempo real. En el presente método, se usan genes que codifican para ARNm expresados en la placenta y presentes en el cromosoma de interés. Por ejemplo, DSCR4 (región crítica 4 del síndrome de Down) se encuentra en el cromosoma 21 y se expresa principalmente en la placenta. Su secuencia de ARNm puede encontrarse en GenBank NM005867. En este caso, se prefiere usar transcriptasas inversas (RT) negativas para ARNasa H (ARNasa H-) para preparar ADNc para la detección. Están disponibles RT ARNasa H- de varios fabricantes, siendo SuperScript™ II (Invitrogen) la más ampliamente usada. Puede usarse PCR con transcriptasa inversa tal como se describe a continuación para el ADN cromosómico.

i. Enriquecimiento de ADN o ARN a partir de plasma

La sangre materna puede procesarse para enriquecer la concentración de ADN fetal en el ADN total, tal como se describe en Li *et al.*, citado anteriormente. En resumen, se extrae ADN circulatorio de 5 a 10 ml de plasma materno usando tecnología en columna comercial (kit de purificación de ADN molde High Pure de Roche; Roche, Basilea, Suiza) en combinación con una bomba de vacío. Tras la extracción, se separa el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (al 1%) (Invitrogen, Basilea, Suiza), y se corta cuidadosamente la fracción de gel que contiene ADN circulatorio con un tamaño de aproximadamente 300 pb. Se extrae el ADN de este corte de gel usando un kit de extracción (kit de extracción de gel QIAEX II; Qiagen, Basilea, Suiza) y se eluye en un volumen final de 40 µl de ácido trisclorhídrico 10 mM, pH 8,0 (Roche).

Puede concentrarse el ADN mediante métodos conocidos, incluyendo centrifugación y diversos inhibidores enzimáticos. El ADN se une a una membrana selectiva (por ejemplo, sílice) para separarlo de contaminantes. El ADN está enriquecido preferiblemente en fragmentos que circulan en el plasma, que son inferiores a 1000 pares de bases de longitud, generalmente inferiores a 300 pb. Esta selección por tamaño se realiza en un medio de separación por tamaño del ADN, tal como un gel electroforético o material de cromatografía. Se describe un material de este tipo en Huber *et al.*, "High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles", Nucleic Acids Res. 11 de marzo de 1993; 21(5): 1061-1066, cromatografía de filtración en gel, gel TSK, tal como se describe en Kato *et al.*, "A New Packing for Separation of DNA Restriction Fragments by High Performance Liquid Chromatography", J. Biochem, 1984, vol. 95, n.º 1 83-86.

Además, puede lograrse el enriquecimiento mediante la supresión de determinados alelos a través del uso de ácidos nucleicos peptídicos (PNA), que se unen a sus secuencias diana complementarias, pero no se amplifican.

Se describe la extracción de ARN plasmático en Enders *et al.*, "The Concentration of Circulating Corticotropin-releasing Hormone RNA in Maternal Plasma Is Increased in Preeclampsia", Clinical Chemistry 49: 727-731, 2003. Tal como se describe allí, se mezcla el plasma recogido tras las etapas de centrifugación con reactivo de Trizol LS (Invitrogen) y cloroformo. Se centrifuga la mezcla y se transfiere la fase acuosa a tubos nuevos. Se añade etanol a la fase acuosa. Entonces se aplica la mezcla a una minicolumna RNeasy (Qiagen) y se procesa según las recomendaciones del fabricante.

ii. Extracción de células fetales de la sangre

La solicitud de patente estadounidense 20040137470 concedida a Dhallan, Ravinder S, publicada el 15 de julio de 2004, titulada "Métodos para la detección de trastornos genéticos" (*Methods for detection of genetic disorders*), describe un procedimiento de enriquecimiento de ADN fetal, en el que se recoge sangre en tubos Vacuette con EDTA de 9 ml (número de catálogo NC9897284) y se añaden a cada tubo 0,225 ml de disolución tamponada neutra al 10% que contiene formaldehído (4% p/v), y se invierte suavemente cada tubo. Se almacenan los tubos a 4°C hasta que estén listos para su procesamiento.

Pueden añadirse agentes que impiden la lisis celular o estabilizan membranas celulares a los tubos incluyendo pero sin limitarse a formaldehído, y derivados de formaldehído, formalina, glutaraldehído y derivados de glutaraldehído, agentes de reticulación, agentes de reticulación reactivos con amina primaria, agentes de reticulación reactivos con sulfhidrilo, adición de sulfhidrilo o reducción de disulfuro, agentes de reticulación reactivos con hidratos de carbono, agentes de reticulación reactivos con carboxilo, agentes de reticulación fotorreactivos, agentes de reticulación escindibles, etc. Puede añadirse cualquier concentración de agente que estabiliza membranas celulares o impide la

lisis celular. En una realización preferida, el agente que estabiliza membranas celulares o impide la lisis celular se añade a una concentración que no impide o dificulta reacciones posteriores.

También pueden usarse técnicas de citometría de flujo para enriquecer células fetales (Herzenberg *et al.*, PNAS 76: 1453-1455 (1979); Bianchi *et al.*, PNAS 87: 3279-3283 (1990); Bruch *et al.*, Prenatal Diagnosis 11: 787-798 (1991)). La patente estadounidense n.º 5.432.054 también describe una técnica para la separación de glóbulos rojos nucleados fetales, usando un tubo que tiene una parte superior ancha y una parte inferior estrecha, capilar hecho de polietileno. La centrifugación usando un programa de velocidad variable da como resultado un apilamiento de glóbulos rojos en el capilar basado en la densidad de las moléculas. Se recupera la fracción de densidad que contiene glóbulos rojos de baja densidad, incluyendo glóbulos rojos fetales, y entonces se hemoliza de manera diferencial para destruir preferentemente glóbulos rojos maternos. Se usa un gradiente de densidad en un medio hipertónico para reparar los glóbulos rojos, ahora enriquecidos en glóbulos rojos fetales, de los linfocitos y las células maternas rotas. El uso de una disolución hipertónica contrae los glóbulos rojos, lo que aumenta su densidad, y facilita la purificación de los linfocitos más densos. Tras haberse aislado las células fetales, puede purificarse ADN fetal usando técnicas convencionales en la técnica.

Además, puede añadirse un agente que estabiliza membranas celulares a la sangre materna para reducir la lisis de células maternas incluyendo pero sin limitarse a aldehídos, urea formaldehído, fenol formaldehído, DMAE (dimetilaminoetanol), colesterol, derivados de colesterol, altas concentraciones de magnesio, vitamina E y derivados de vitamina E, calcio, gluconato de calcio, taurina, niacina, derivados de hidroxilamina, bimoclomol, sacarosa, astaxantina, glucosa, amitriptilina, isómero A de tetral fenilacetato de hopano, isómero B de tetral fenilacetato de hopano, citicolina, inositol, vitamina B, complejo de vitamina B, hemisuccinato de colesterol, sorbitol, calcio, coenzima Q, ubiquinona, vitamina K, complejo de vitamina K, menaquinona, zonegran, zinc, extracto de ginkgo biloba, difenilhidantoína, perftoran, polivinilpirrolidona, fosfatidilserina, tegretol, PABA, cromoglicato de disodio, nedocromil sódico, feniloína, citrato de zinc, mexitil, dilantina, hialuronato de sodio o polaxámero 188.

Un ejemplo de un protocolo para usar este agente es tal como sigue: Se almacena la sangre a 4°C hasta su procesamiento. Se centrifugan los tubos a 1000 rpm durante diez minutos en una centrífuga con fuerza de frenado fijada a cero. Se centrifugan los tubos una segunda vez a 1000 rpm durante diez minutos. Se transfiere el sobrenadante (el plasma) de cada muestra a un nuevo tubo y se centrifuga a 3000 rpm durante diez minutos con el freno fijado a cero. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se almacena a -80°C. Se colocan aproximadamente dos mililitros de la "capa leucocítica", que contiene células maternas, en un tubo separado y se almacenan a -80°C.

iii. ADN fetal libre de plasma

Puede aislarse ADN genómico del plasma usando el kit Midi de Qiagen para la purificación de ADN de células sanguíneas, siguiendo las instrucciones del fabricante (kit QIAmp DNA Blood Midi, número de catálogo 51183). Se eluye el ADN en 100 µl de agua destilada. También se usa el kit Midi de Qiagen para aislar ADN de las células maternas contenidas en la "capa leucocítica".

Finalmente, se indica que, en determinadas realizaciones, pueden usarse también muestras de tejido, saliva, orina, lágrimas, secreciones vaginales, fluido de mama, leche de mama o sudor.

B. Distribución de moléculas de ADN

En el método ilustrado, el ADN genómico obtenido de un tejido materno tal como se describió anteriormente se diluye en múltiples muestras de reacción, por ejemplo en placas de múltiples pocillos, de modo que, en promedio, hay menos de un equivalente de genoma por pocillo. Por tanto, cuando se analizan las muestras diferenciadas individuales para determinar la presencia de la anomalía genética que va a someterse a prueba, el ADN (cromosoma) que va a analizarse, en promedio, estará o bien presente o bien ausente, permitiendo el denominado "análisis digital". Una muestra de reacción en general contendrá una única molécula molde (haplotipo), dos moléculas diana (diploide) o tres moléculas diana (trisomía).

Los pocillos proporcionan muestras de reacción diferenciadas y pueden implementarse en varios dispositivos, tales como placas de microtitulación, perlas en una emulsión o un dispositivo microfluídico. Estos se describen en detalle a continuación. El dispositivo debe poder llevar a cabo un gran número de reacciones de amplificación diferenciadas. Tal como se describe a continuación, este número debe ser, como mínimo, de 10.000 reacciones, y preferiblemente del orden de 100.000 reacciones. La muestra de reacción preferiblemente contiene aproximadamente 10-100 µl de una muestra de reacción PCR que contiene el ADN genómico, nucleótidos (dNTP), polimerasa y cebadores de PCR apropiados. Los cebadores se usan conjuntamente con marcador para una detección cuantitativa rápida de los productos de PCR. El tipo de marcaje dependerá del sistema de amplificación/detección usado, por ejemplo, una sonda fluorescente de "baliza molecular" para amplificación basada en placa de microtitulación. Este tipo de sonda se describe, por ejemplo, en Vogelstein *et al.*, citado anteriormente. Alternativamente, el marcaje puede realizarse con SYBR Green, que tiene una fluorescencia muy baja en ausencia de ADN bicatenario y una fluorescencia muy alta en presencia de ADN bicatenario.

Otra forma de análisis en paralelo útil en la presente invención es el análisis de moléculas individuales. De nuevo, se

5 diluye una muestra para que contenga menos de un equivalente de genoma individual nominal de ADN, y puede determinarse la presencia de la diana de interés (es decir, trisomía del cromosoma 21) en un gran número de muestras. Analizando un gran número de muestras, puede distinguirse el ADN del ADN materno. Esto se denomina un “análisis digital”, porque cada pocillo tendrá, en promedio, un equivalente de genoma por célula, y además, la dilución puede leerse como un resultado de “sí-no” binario en cuanto a la presencia del cromosoma u otra secuencia que va a contarse.

Otro método para el análisis de moléculas individuales implica el uso de etiquetas fluorescentes específicas de sitio que se detectan a medida que se hace pasar el ADN a través de un dispositivo microfluídico en un flujo alargado, de molécula individual. Un ejemplo de esta técnica, descrito a continuación, se denomina “análisis lineal directo”, o DLA.

10 C. Detección y cuantificación

Habiendo aislado el ADN de muestra en un equivalente de genoma nominal, debe cuantificarse la presencia de la secuencia de ADN o cromosoma de interés. Esto puede hacerse o bien en un modo de molécula individual, o bien con un producto amplificado.

15 Aunque la realización preferida de la invención se describe en cuanto a PCR, la invención se refiere principalmente al uso de detecciones de secuencias genéticas individuales múltiples. En algunas realizaciones, el método de amplificación puede ser, por ejemplo, reacción de secuencia autosostenida, reacción en cadena de la ligasa, amplificación rápida de extremos de ADNc, reacción en cadena de la polimerasa y reacción en cadena de la ligasa, amplificación de fago Q-beta, amplificación por desplazamiento de cadena o reacción en cadena de la polimerasa de extensión de solapamiento de corte y empalme.

20 Además, aunque la detección puede llevarse a cabo convenientemente mediante una sonda específica de secuencia, la detección también puede llevarse a cabo secuenciando directamente una región de interés para determinar si es la secuencia diana de interés.

1. Métodos de PCR digital

25 Aunque los métodos de PCR actualmente conocidos pueden multiplexarse, es decir, ejecutarse con múltiples cebadores para múltiples dianas, se prefiere limitar el número de pares de cebadores en una reacción dada. Generalmente, habrá dos pares de cebadores: uno para amplificar una secuencia de prueba y otro par para amplificar una secuencia de control. Se diseñan cebadores según parámetros conocidos para evitar estructuras secundarias y autohibridación. Además, ambos pares de cebadores deben aparearse y fundirse a aproximadamente las mismas temperaturas.

30 Cebadores

Pueden prepararse cebadores mediante una variedad de métodos incluyendo pero sin limitarse a la clonación de secuencias apropiadas y síntesis química directa usando métodos bien conocidos en la técnica (Narang *et al.*, *Methods Enzymol.* 68:90 (1979); Brown *et al.*, *Methods Enzymol.* 68:109 (1979)). También pueden obtenerse cebadores de fuentes comerciales tales como Operon Technologies, Amersham Pharmacia Biotech, Sigma y Life Technologies. Los cebadores pueden tener una temperatura de fusión idéntica. Las longitudes de los cebadores pueden extenderse o acortarse en el extremo 5' o el extremo 3' para producir cebadores con temperaturas de fusión deseadas. Además, la posición de apareamiento de cada par de cebadores puede diseñarse de manera que la secuencia, y la longitud de los pares de cebadores, produzca la temperatura de fusión deseada. La ecuación más sencilla para determinar la temperatura de fusión de cebadores menores de 25 pares de bases es la regla de Wallace ($T_d=2(A+T)+4(G+C)$). También pueden usarse programas informáticos para diseñar cebadores, incluyendo pero sin limitarse a Array Designer Software (Arrayit Inc.), Oligonucleotide Probe Sequence Design Software for Genetic Analysis (Olympus Optical Co.), NetPrimer y DNAsis de Hitachi Software Engineering. La *TM* (temperatura de fusión o apareamiento) de cada cebador se calcula usando programas de software tales como Oligo Design, disponible de Invitrogen Corp.

45 La temperatura de apareamiento de los cebadores puede recalcularse y aumentarse tras cualquier ciclo de amplificación, incluyendo pero sin limitarse a ciclo 1, 2, 3, 4, 5, ciclos 6-10, ciclos 10-15, ciclos 15-20, ciclos 20-25, ciclos 25-30, ciclos 30-35 o ciclos 35-40. Tras los ciclos de amplificación iniciales, se incorpora la mitad en 5' de los cebadores en los productos de cada locus de interés, por tanto puede recalcularse la *TM* basándose en las secuencias de tanto la mitad en 5' como la mitad en 3' de cada cebador. Puede usarse cualquier ADN polimerasa que cataliza la extensión del cebador incluyendo pero sin limitarse a ARN polimerasa de *E. coli*, fragmento Klenow de ADN polimerasa 1 de *E. coli*, ADN polimerasa de T7, ADN polimerasa de T4, Taq polimerasa, Pfu ADN polimerasa, Vent ADN polimerasa, bacteriófago 29, ADN genómico polimerasa REDTaq.TM. o secuenasa. Preferiblemente, se usa una ADN polimerasa termoestable. También puede realizarse una PCR “de inicio caliente” en la que la reacción se calienta hasta 95°C durante dos minutos antes de la adición de la polimerasa o la polimerasa se mantiene inactiva hasta la primera etapa de calentamiento en el ciclo 1. Puede usarse PCR “de inicio caliente” para minimizar la amplificación no específica. Puede usarse cualquier número de ciclos de PCR para amplificar el ADN, incluyendo pero sin limitarse a 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 45 ciclos. En la realización más preferida, el número de ciclos de PCR realizados es tal que se producen cantidades equimolares de cada locus de

interés.

5 Varios cebadores de PCR específicos son útiles en el presente procedimiento, tales como los dados a conocer en la bibliografía técnica de Qiagen. La bibliografía describe un protocolo en el que se purificó ADN a partir de sangre periférica y cultivos de amniocitos usando el kit QIAmp DNA Blood Mini. Para la amplificación del gen de amiloide en el cromosoma 21, (ID de gen de NCBI 473931, registro NC006488), las secuencias de cebadores y sonda fueron:

SEQ ID NO: 1: cebador directo, 5'-GGG-AGC TGG TAC AGA AAT GAC TTC-3'; cebador inverso, SEQ ID NO: 10: 5'-TTG CTC ATT GCG CTG ACA A-3; y sonda, SEQ ID NO: 2 5'-(FAM) AGC CAT CCT TCC CGG GCC TAG G (TAMRA)-3'.

10 Para la amplificación de GAPDH, (locus de GenBank 12p13.31-p13.1), los cebadores y la sonda fueron: cebador directo, SEQ ID NO: 3, 5'-CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC-3'; cebador inverso, SEQ ID NO: 4, 5'-CCT ACT CCC AGG GCT TTG ATT-3'; y sonda, SEQ ID NO: 5, 5'-(VIC) AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC (TAMRA)-3'. Se realizó la PCR usando el sistema TaqMan, con 2 µl de ADN molde en cada reacción de 25 µl y concentraciones finales de 300 nmol/litro de cada cebador y 150 nmol/litro de cada sonda TaqMan doblemente marcada. Las condiciones de ciclado fueron incubación a 50°C durante 2 minutos, luego 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 60°C, 1 minuto y 95°C, 15 segundos.

15 Usando el protocolo a modo de ejemplo anterior, la razón diferente del gen de amiloide y el gen de GAPDH en muestras cariotípicamente normales y con trisomía del cromosoma 21 era claramente distinguible en el ensayo de PCR múltiple, tal como se notifica en la bibliografía de producto de Qiagen. Ensayos usando una serie de dilución del molde de ADN mostraron que la diferencia seguía siendo clara a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones de molde y con concentraciones de partida de ADN tan bajas como 10 mg/litro. Por supuesto, en una muestra de sangre materna, la concentración de ADN fetal sería mucho más baja.

Amplificación *in situ* fluorescente

25 Tecnologías a base de sondas fluorescentes, que pueden realizarse en los productos de PCR "in situ" (es decir, en los mismos pocillos), son particularmente muy adecuadas para esta solicitud. Este método se describe en detalle en Vogelstein PNAS 96:9236, citado anteriormente, y Vogelstein *et al.* "Digital Amplification", documento US 6.440.705, incorporado por el presente documento como referencia para su descripción de este procedimiento de amplificación.

30 El método de "digi-PCR" de Vogelstein *et al.* se describe en la patente mencionada anteriormente. Un protocolo a modo de ejemplo tal como se expone en esa patente es tal como sigue: se realiza la PCR en volúmenes de 7 µl en placas de PCR de polipropileno de 96 pocillos (Marsh Biomedical Products, Rochester, N.Y.). La composición de las reacciones es: Tris 67 mM, pH 8,8, NH₄SO₄ 16,6 mM, MgCl₂ 6,7 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, TTP 1 mM, DMSO al 6%, cebador F1 1 µM, cebador R1 1 µM, Platinum Taq polimerasa 0,05 unidades/µl (Life Technologies, Inc.), y "medio equivalente de genoma" de ADN.

35 Para determinar la cantidad ADN correspondiente a medio equivalente de genoma, se diluyen en serie muestras de ADN y se someten a prueba mediante PCR. La cantidad que producía productos de amplificación en la mitad de los pocillos, de manera habitual aproximadamente 1,5 pg de ADN total, se define como "medio equivalente de genoma" y se usa en cada pocillo de experimentos de amplificación digital posteriores. Se añaden cincuenta µl de aceite mineral ligero (Sigma M-3516) a cada pocillo y se realizan las reacciones en un termociclador HybAid a las siguientes temperaturas: desnaturalización a 94°C durante un min.; 60 ciclos de 94°C durante 15 s, 55°C durante 15 s, 70°C durante 15 segundos; 70°C durante cinco minutos.

40 Pueden usarse tal como sigue MB, o sondas de balizas moleculares, que se vuelven fluorescentes al unirse a la(s) secuencia(s) diana, tal como se describe en más detalle a continuación.

45 Para el análisis de fluorescencia, se añaden 3,5 µl de una disolución con la siguiente composición a cada pocillo: Tris 67 mM, pH 8,8, NH₄SO₄ 16,6 mM, MgCl₂ 6,7 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, TTP 1 mM, DMSO al 6%, cebador 5 µM, MB-GREEN 1 µM, MB-RED 1 µM, Platinum Taq polimerasa 0,1 unidades/µl. Se centrifugan las placas durante 20 segundos a 6000 g y se lee la fluorescencia a longitudes de onda de excitación/emisión de 485 nm/530 nm para MB-GREEN y 530 nm/590 nm para MB-RED. Se colocan entonces las placas en un termociclador para amplificación asimétrica a las siguientes temperaturas: 94°C durante un minuto; 10-15 ciclos de 94°C durante 15 s, 55°C durante 15 s., 70°C durante 15 segundos; 94°C durante minuto; y 60°C durante cinco minutos. Se incuban entonces las placas a temperatura ambiente durante de diez a sesenta minutos y se mide la fluorescencia tal como se describió anteriormente.

55 Las sondas de MB son oligonucleótidos con estructuras de tallo-bucle que contienen un colorante fluorescente en el extremo 5' y un agente de extinción (dabcilo) en el extremo 3'. El grado de extinción mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia es inversamente proporcional a la 6ª potencia de la distancia entre el grupo dabcilo y el colorante fluorescente. Tras calentar y enfriar, las sondas de MB vuelven a formar una estructura de tallo-bucle, que extingue la señal fluorescente del colorante. Si está presente un producto de PCR cuya secuencia es complementaria a la secuencia de bucle durante el ciclo de calentamiento/enfriamiento, la hibridación de la MB con

una hebra del producto de PCR aumentará la distancia entre el dabcilo y el colorante, dando como resultado un aumento de la fluorescencia.

Los ejemplos a continuación usan un protocolo de PCR, que también se basa en sondas de tipo MB, excepto porque es en relación con un dispositivo microfluídico.

5 Los presentes métodos de PCR digital pueden usarse con ARN así como ADN. El aislamiento de ARN plasmático se describe a continuación. En este caso, se preparan copias de ADNc y luego se amplifican mediante PCR basada en ADN polimerasa. Pueden usarse diferentes cebadores para la síntesis de ADNc. Se prefieren moldes específicos, basados en secuencias genéticas en los cromosomas de interés. Véase, Bustina *et al.*, "Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction", *Journal of Biomolecular Techniques*, 15:155-166 (2004). El uso de ARNm a partir de genes expresados de manera constitutiva, es decir, de mantenimiento, puede usarse para un control, y se prefieren genes que se expresan altamente en la placenta (descritos a continuación). Actualmente están disponibles cuatro químicas diferentes, TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), balizas moleculares, Scorpions® y SYBR® Green (Molecular Probes), para la PCR en tiempo real. Todas estas químicas permiten la detección de productos de PCR mediante la generación de una señal fluorescente y pueden adaptarse a PCR con transcripción inversa. El kit de RT MessageSensor™ de Ambion incluye una RT de MMLV ARNasa H+. MessageSensor incluye un control de ARN total, un conjunto de cebadores de GAPDH humana control, inhibidor de ARNasa y nucleótidos, así como un aditivo de tampón que permite la detección con el colorante SYBR® Green. Ambion recomienda usar ARNr 18S como control interno porque muestra menos varianza en la expresión a lo largo de las condiciones de tratamiento que β -actina y GAPDH. Un gen codificado por el cromosoma 21 (LOC90625) que muestra fuerte expresión en una placenta de primer trimestre similar a CSH1 (lactógeno placentario humano) y se seleccionó para el análisis de plasma en Oudejans *et al.*, "Detection of Chromosome 21-encoded RNAm of Placental Origin in Maternal Plasma", *Clinical Chemistry* 49: 1445-1449, 2003. Se facilitan en este artículo cebadores específicos para su uso con este gen. Se describen transcritos del cromosoma 21 expresados de manera única en Gardiner *et al.*, "Analysis of human chromosome 21: correlation of physical and cytogenetic maps; gene and CpG island distributions", *E.M.B.O.J.* 9(1): 25-34 (1990), concretamente ADNc de productos identificados ETS2, MX1, MX2, CBS, COL6A1 y BCE1, que pueden secuenciarse o mapearse parcialmente según los presentes métodos.

2. PCR en emulsión de perlas

Se ha usado PCR en emulsión para preparar perlas pequeñas con ADN amplificado de manera clonal (en esencia, cada perla contiene un tipo de amplicón de PCR digital. (Dressman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 8817 (22 de julio de 2003)). Usando cebadores específicos para regiones de los cromosomas A y B mientras se realiza la PCR en emulsión, se crearán perlas con amplicones digitales a partir de sólo estos dos cromosomas, y sólo es necesario contar el número de perlas positivas de cada tipo. Hay muchos modos de hacer esto; se indicarán dos de ellos. En primer lugar, usar dos especies diferentes de perlas (o bien en tamaño o bien marcaje fluorescente) para anclar los dos amplicones respectivamente. Alternativamente, pueden marcarse los cebadores no anclados con diferentes fluoróforos y usar un único tipo de perla. Tras la amplificación, las perlas positivas (amplicones) de cada tipo pueden contarse con métodos tales como citometría de flujo o simplemente contándolas en un microscopio adecuadamente equipado.

Esta técnica se describe adicionalmente en Dressman *et al.* (citado anteriormente) y Dressman *et al.* publicación PCT W02005010145, "METHOD AND COMPOSITIONS FOR DETECTION AND ENUMERATION OF GENETIC VARIATIONS", publicada el 03-02-2005, e incorporada por el presente documento como referencia para su descripción de un procedimiento basado en células. En resumen, en la etapa 1, se unen perlas magnéticas recubiertas covalentemente con estreptavidina a oligonucleótidos biotinilados ("oligos"). En la etapa 2, se agita una mezcla acuosa que contiene todos los componentes necesarios para la PCR más perlas unidas a cebador y ADN molde junto con una mezcla de aceite/detergente para crear microemulsiones. Los compartimientos acuosos (que pueden ilustrarse como pequeñas gotitas en una fase de aceite) contienen en promedio < 1 molécula molde y < 1 perlas. Pueden imaginarse diferentes moldes (control y prueba) en una o más gotitas para representar dos moléculas molde cuyas secuencias difieren en uno o muchos nucleótidos. En la etapa 3, se someten las microemulsiones a ciclos de temperatura como en una PCR convencional. Si un molde de ADN y una perla están presentes juntas en un único compartimiento acuoso, los oligonucleótidos unidos a perlas actúan como cebadores para la amplificación. Entonces, pueden imaginarse líneas rectas que corresponden a productos de PCR unidos a los correspondientes moldes conectadas a las perlas para representar productos de extensión a partir de dos clases diferentes de moldes. En la etapa 4, se descomponen las emulsiones y se purifican las perlas con un imán. En la etapa 5, tras la desnaturalización, se incuban las perlas con oligonucleósidos que pueden distinguir entre las secuencias de las diferentes clases de moldes. Entonces se usan anticuerpos marcados de manera fluorescente para marcar las sondas de hibridación unidas. Esto hace que las sondas que contienen producto de PCR tengan colores diferentes (por ejemplo, rojo o verde) tras la excitación con láser apropiada. En la etapa 6, se usa citometría de flujo para contar las perlas de color rojo y verde. Preferiblemente, cada perla está unida a al menos 10, 50, 100, 500 ó 1000 moléculas de la misma secuencia de ácido nucleico.

Para fines de descripción detallada, se toma el siguiente ejemplo de la publicación PCT anteriormente citada:

60 Protocolo a modo de ejemplo detallado usando emulsiones de perlas

- 5 Etapa 1-Acoplamiento de oligonucleótidos a perlas. Se adquieren perlas superparamagnéticas de $1,05 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de diámetro, unidas covalentemente a estreptavidina, de Dynal Biotech, Inc. (650,01, Lake Success; NY). Se lavan las perlas una vez con 1x tampón de PCR (53286, Invitrogen, Carlsbad, CA), luego se suspenden en tampón de unión y lavado (BWB) (Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,5). Se incuban las perlas en BWB durante 30 min. a temperatura ambiente en presencia de oligonucleótidos $10 \mu\text{M}$. Estos oligonucleótidos están modificados con un grupo biotina doble en el extremo 5' con los grupos biotina separados por un ligador de seis carbonos (IDT, Coralville, IA). Tras la unión, se lavan las perlas 3 veces con 1x tampón de PCR para eliminar meticulosamente los oligonucleótidos no unidos.
- 10 Etapa 2-Preparación de microemulsiones. Se preparan microemulsiones para PCR en una fase de aceite que está compuesta por Span 80 al 4,5% (S6760, Sigma, St. Louis, MO), Tween 80 al 0,40% (Sigma S-8074) y Triton X-100 al 0,05% (Sigma T-9284) en aceite mineral (Sigma M-3516). La fase acuosa consiste en Tris-HCl 67 mM (pH 8,8), NH_4SO_4 16,6 mM, MgCl_2 6,7 mM, 3-mercaptoetanol 10 mM, dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 1 mM, cebador directo $0,05 \mu\text{M}$, cebador inverso $25 \mu\text{M}$, 45 unidades de Platinum Taq (Invitrogen 10966-034), diversas cantidades de ADN molde y ~108 perlas acopladas a oligonucleótidos en un volumen total de $300 \mu\text{l}$. El cebador
- 15 directo es un oligonucleótido cuya secuencia es idéntica a los 20-22 nt en 3' del descrito en la etapa 1 y no está modificado con biotina.
- Se preparan emulsiones de agua en aceite mediante adición gota a gota de 200 microlitros de la fase acuosa a 400 microlitros de la fase de aceite colocada en un vial criogénico de fondo redondo de 2 ml (430661, Corning, Corning, NY).
- 20 La adición gota a gota se realiza a lo largo de un minuto mientras la mezcla está agitándose a 1400 RPM con una barra de microagitación magnética (58948-353, VWR, Plainfield, NJ) en un agitador magnético VWR modelo 565. Tras la adición de la fase acuosa, continúa agitándose la mezcla durante un tiempo total de 30 minutos. Se preparan dos emulsiones de una vez colocando dos tubos en una rejilla colocada en el centro del agitador magnético.
- 25 Etapa 3-Ciclado de PCR. Se alicuotan las emulsiones en cinco pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos, que contiene cada uno $100 \mu\text{l}$. Se lleva a cabo la PCR en las siguientes condiciones de ciclado: 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 57°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos. Los productos de PCR analizados en este estudio oscilaban entre 189 y 239 pb.
- 30 Etapa 4-Captura magnética de perlas. Tras el ciclado de PCR, se agrupan las microemulsiones de los cinco pocillos de una placa de PCR y se descomponen mediante la adición de 800 microlitros de tampón NX (NaCl 100 mM que contiene Triton X-100 al 1%, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) en un tubo de 1,5 ml (Corning 430909). Tras agitar con vórtex durante 20 s, se sedimentan las perlas mediante centrifugación en una microcentrífuga a 8000 rpm (5000 g) durante 90 segundos. Se eliminan del tubo la fase de aceite superior, y todo menos 300 microlitros de la fase acuosa, y se añaden 600 microlitros de tampón NX. Se repiten estas etapas. Entonces se coloca el tubo en un imán (Dynal MPC-S) y se elimina por pipeteo el resto del sobrenadante cuidadosamente. Se lavan las perlas 3 veces
- 35 adicionales con 1x tampón de PCR usando separación magnética en vez de centrifugación y finalmente se resuspenden en 100 microlitros de 1x tampón de PCR.
- 40 Etapa 5-Diferenciación de secuencias. Se usan dos sondas oligonucleotídicas para cada reacción. Una está marcada en 5' con 6-carboxifluoresceína (6-FAM) y es específica para un alelo mientras que la segunda está marcada en 5' con biotina y es específica para el otro alelo. Se sintetizan las sondas mediante IDT. Las reacciones de hibridación de 30 microlitros contenían $10 \mu\text{M}$ de cada sonda y 5-25 millones de perlas en 1 x tampón de PCR. Se realizan las reacciones en placas de PCR en un termociclador calentando hasta 94°C durante 30 segundos, luego enfriando hasta 75°C a una velocidad de $0,5^\circ\text{C}$ por segundo, enfriando hasta 45°C a $0,2^\circ\text{C}$ por segundo y finalmente se enfría hasta 30°C a 1°C por segundo.
- 45 Todas las etapas posteriores se realizan a temperatura ambiente. Se transfieren las reacciones a una placa Costar de 96 pocillos (Corning 3797) y se coloca en un imán de 96 pocillos. Se recogen las perlas magnéticamente exponiéndolas al imán durante 2 minutos. Se elimina el sobrenadante y se lavan las perlas 3 veces con 1x tampón de PCR pipeteándolas y recogiendo durante dos minutos. Se resuspenden finalmente en 100 microlitros de tampón de B-PCR (BSA 1 mg/ml en 1x tampón de PCR).
- 50 Se incuban entonces las perlas durante 10 minutos en un volumen total de 100 microlitros de tampón de B-PCR que contiene $3 \mu\text{g}$ de anticuerpo de conejo anti-fluoresceína Alexa-488 (Molecular Probes A-11090, Eugene, OR) y $3 \mu\text{g}$ de nutravidina marcada con R-ficoeritrina (Molecular Probes A-2660) en tampón de B-PCR. Se lavan las perlas tres veces y se resuspenden en tampón de B-PCR tal como se describió anteriormente. Se incuban entonces durante diez minutos en un volumen total de 100 microlitros de tampón de B-PCR que contiene $6 \mu\text{g}$ de anticuerpo de pollo anti-conejo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes A-21441) y $3 \mu\text{g}$ de anticuerpo de cabra anti-avidina biotinilado (BA-0306, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se lavan las perlas tres veces y se resuspenden en
- 55 tampón de B-PCR tal como se describió anteriormente. Entonces se incuban durante diez minutos en un volumen total de 100 microlitros de tampón de B-PCR que contiene $3 \mu\text{g}$ de un anticuerpo de cabra anti-pollo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes A-11039) y 3 microgramos de estreptavidina marcada con R-ficoeritrina (Molecular Probes S-866). Se lava entonces esta disolución 3 veces adicionales con 1x tampón de PCR y se resuspende en 20

microlitros de 1 X tampón de PCR.

Etapa 6-Citometría de flujo. Se diluye la suspensión de perlas hasta una concentración de 10⁶-10⁷ perlas por ml en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (351-010-131, Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD) y se analiza usando un instrumento LSR (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). El instrumento está ideado para análisis de dos colores convencional usando un láser de argón y filtros ópticos que distinguían entre los dos colorantes fluorescentes. No se requiere deconvolución espectral ya que las poblaciones de perlas principales están bien separadas. En algunos casos, se realiza exploración con instrumentos FACScan o FACSCalibur (BD Biosciences).

3. Dilución microfluidica con PCR

Otro enfoque para la PCR digital implica el uso de dispositivos microfluidicos para lograr las condiciones de PCR digital usadas en el presente método.

Generalmente, se diluye una muestra de ADN obtenida tal como se describió anteriormente en una concentración apropiada, se mezcla con reactivos de PCR, cebadores, dNTP, etc. y se somete a flujo a través de varios canales que pueden cerrarse en múltiples segmentos, dando como resultado varias muestras de reacción diferenciadas, o cámaras. Las cámaras pueden someterse a termociclado de PCR y los productos detectarse cuantitativamente mediante fluorescencia, tal como se describió anteriormente.

Un dispositivo microfluidico adecuado se produce por Fluidigm Corporation, denominado IFC (circuito de fluidos integrado) de aislamiento y detección digital. También se describe un dispositivo adecuado en la patente estadounidense 6.960.437 concedida a Enzelberger, *et al.*, expedida el 1 de noviembre de 2005 titulada "Amplificación de ácido nucleico utilizando dispositivos microfluidicos" (*Nucleic acid amplification utilizing microfluidic devices*), que describe un dispositivo microfluidico que puede soportar múltiples amplificaciones y detecciones de ácidos nucleicos en paralelo. Tal como se describe en esta patente, un dispositivo microfluidico a modo de ejemplo para realizar reacciones de termociclado incluye en la capa con los canales de flujo una pluralidad de entradas de muestras, una unión en T de mezclado, un bucle de circulación central (es decir, el canal de flujo sustancialmente circular) y un canal de salida. La intersección de un canal de control con un canal de flujo puede formar una microválvula. Esto es así porque los canales de control y flujo están separados por una membrana elastomérica fina que puede desviarse hacia el canal de flujo o retraerse del mismo. El desvío o retracción de la membrana elastomérica se logra generando una fuerza que provoca que se produzca el desvío o retracción. En determinados sistemas, esto se logra aumentando o disminuyendo la presión en el canal de control en comparación con el canal de flujo con el que el canal de control forma una intersección. Sin embargo, puede utilizarse una amplia variedad de otros enfoques para accionar las válvulas incluyendo diversos enfoques electrostáticos, magnéticos, electrolíticos y electrocinéticos. Otro dispositivo microfluidico, adaptado para realizar reacciones de PCR, y útil en los presentes métodos, se describe en el documento US 2005/0252773 por McBride, *et al.*, publicado el 17 de noviembre de 2005, titulado "Dispositivo de reacción térmica y método para usar el mismo" (*Thermal reaction device and method for using the same*).

El bucle central sustancialmente circular y los canales de control que forman una intersección con el mismo forman la parte central de la bomba rotatoria. La(s) bomba(s) que provoca(n) que la disolución fluya a través del canal de flujo sustancialmente circular consiste(n) en un conjunto de al menos tres canales de control que están adyacentes entre sí y que forman una intersección con el canal de flujo de rama sustancialmente circular (es decir, el bucle central). Cuando se aplica una serie de secuencias de accionamiento de encendido/apagado a los canales de control, el fluido en el bucle central puede bombearse peristálticamente en una dirección elegida, de manera o bien horaria o bien antihoraria. La acción de bombeo peristáltico da como resultado el desvío secuencial de las membranas que separan los canales de control y el canal de flujo hacia el interior o el exterior del canal de flujo. En general, cuando más alta sea la frecuencia de accionamiento, más rápido rota el fluido a través del bucle central. Sin embargo, se alcanza finalmente un punto de saturación en el que el aumento de la frecuencia no da como resultado un flujo de fluido más rápido. Esto se debe principalmente a limitaciones en la velocidad a la que la membrana puede regresar a una posición no accionada. Un sistema mostrado a modo de ejemplo tiene dos conjuntos de bombas (es decir, dos conjuntos de tres canales de control que recubren el canal de flujo sustancialmente circular) y puede utilizarse una única bomba (es decir, un único conjunto de tres canales de control que recubren el canal de flujo sustancialmente circular). Además, aunque se muestra que cada bomba incluye tres canales de control, pueden utilizarse más canales de control. Debe entenderse también que los tres canales de control pueden ser segmentos diferentes de un único canal de control que recubre el canal de flujo.

La descripción detallada del análisis de múltiples muestras que está llevándose a cabo en pocillo no significa que sea necesario que las secuencias diana estén físicamente separadas en pocillos, ya que las secuencias pueden estar en muestras que están aisladas simplemente al estar sobre perlas diferentes (tal como se describió anteriormente) o mediante adherencia a zonas diferentes de un sustrato (tal como se describe a continuación).

4. Métodos de detección/secuenciación de moléculas individuales

Debe apreciarse que los métodos que implican PCR u otra amplificación no son la única manera de detectar o enumerar las moléculas en una muestra de reacción diferenciada dada. Es posible usar citometría de flujo de

moléculas individuales para contar moléculas individuales que se han marcado con una sonda fluorescente específica de secuencia. También es posible secuenciar la secuencia diana en la muestra de reacción directamente, o bien tras amplificación o bien a nivel de molécula individual.

Incorporación de nucleótidos fluorescentes por ADN polimerasa

5 Tal como se describe en la publicación de PNAS a la que se hizo referencia anteriormente de Braslavsky *et al.*, puede emplearse ADN polimerasa para obtener imágenes de información de secuencia en un molde de ADN individual a medida que se sintetiza la hebra complementaria. Los nucleótidos se insertan secuencialmente; sólo se requiere la resolución en el tiempo para diferenciar las incorporaciones sucesivas. Tras cada acontecimiento de
10 incorporación satisfactorio, se mide una señal fluorescente y después se anula mediante fotoblanqueado. Este método se presta por sí mismo a paralelismo masivo.

En resumen, esta técnica permite observaciones de fluorescencia de moléculas individuales mediante un microscopio convencional equipado con iluminación de reflexión interna total, que reduce la fluorescencia de fondo. La superficie de un portaobjetos de cuarzo se trata químicamente para anclar específicamente moldes de ADN mientras se impide la unión no específica de nucleótidos libres, y se une una célula de flujo de plástico a la superficie
15 para intercambiar disoluciones. Se hibridan oligonucleótidos de molde de ADN con un cebador marcado fluorescentemente y unido a la superficie mediante estreptavidina y biotina con una densidad superficial lo suficientemente baja como para resolver moléculas individuales. Los moldes cebados se detectan a través de sus etiquetas fluorescentes, sus ubicaciones se registran para futura referencia y las etiquetas se fotoblanquean. Los trifosfatos de nucleótido marcados y la enzima ADN polimerasa se lavan entonces dentro y fuera de la célula de flujo
20 mientras que las ubicaciones conocidas de los moldes de ADN se monitorizan para detectar la aparición de fluorescencia. La técnica usa una combinación de microscopía de onda evanescente y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de par individual (spFRET) para rechazar el ruido no deseado. El fluoróforo donador excita aceptores solo dentro del radio de Forster, creando así eficazmente una fuente de campo cercano de resolución extremadamente alta. Debido a que el radio de Forster de este par de fluoróforos es de 5 nm, la resolución espacial de este método excede el límite de difracción en un factor de 50 y la microscopía de campo
25 cercano convencional en un orden de magnitud.

El ADN genómico del tejido tomado de la madre, es decir, la mezcla de material genético materno y fetal, puede distribuirse en muestras diferenciadas que se anclan a una superficie y se secuencian o monitorizan mediante sondas marcadas para detectar una secuencia específica de diana, por ejemplo, una región única del cromosoma
30 21, por ejemplo, AML1. Puede encontrarse orientación adicional para la preparación de secuencias únicas del cromosoma 21, por ejemplo, en Fuscoe *et al.*, "An Efficient Method for Selecting Unique-Sequence Clones from DNA Libraries and Its Application To Fluorescent Staining of Chromosome 21 human Using in Situ Hybridation", *Genomics*, vol. 5, 1989, págs. 100-109. Una metodología útil en la plataforma de la presente invención se basa en la secuenciación masiva en paralelo de millones de fragmentos usando la unión de ADN genómico fragmentado
35 aleatoriamente a una superficie ópticamente transparente, plana y amplificación de fase sólida para crear una célula de flujo de secuenciación de alta densidad con millones de conglomerados, conteniendo cada uno ~1.000 copias de molde por cm cuadrado. Estos moldes se secuencian usando tecnología de secuenciación por síntesis de ADN de cuatro colores. Véanse los productos ofrecidos por Illumina, Inc., San Diego California. Véase también el documento US 2003/0022207 concedido a Balasubramanian, *et al.*, publicado el 30 de enero de 2003, titulado "Polinucleótidos alineados y su uso en análisis de genoma" ("*Arrayed polinucleotides and their use in genome analysis*").
40

La secuenciación puede combinarse con métodos basados en amplificación en un chip microfluídico que tiene cámaras de reacción tanto para PCR como para secuenciación basada en molde microscópico. Solo se necesitan aproximadamente 30 pb de información de secuencia aleatoria para identificar que una secuencia pertenece a un cromosoma humano específico. Secuencias más largas solamente pueden identificar dianas más particulares. Un algoritmo para diseñar secuencias únicas se describe en Yamada, *et al.* "PrimerStation: a highly specific multiplex genomic PCR primer design server for the human genome", *Nucleic Acids Res.*, 1 de julio de 2006; 34(Web Server issue): W665 - W669, ilustrativo de métodos de software que pueden usarse para identificar una secuencia en comparación con la secuencia de genoma conocida. Véase también Zhu *et al.*, "Single molecule profiling of alternative pre-mRNA splicing", *Science*. 8 de agosto de 2003 301(5634):836-838, que describe una tecnología
45 basada en moléculas individuales para estudiar ARNm.
50

Análisis lineal directo (DLA)

Otro método de determinación de la identidad de ADN genómico a partir de las presentes muestras se denomina análisis lineal directo, y se describe en Chan *et al.* "ADN Mapping Using Microfluidic Stretching and Single-Molecule Detection of Fluorescent Site-Specific Tags", *Genome Research* 14:1137-1146 (2004). En este método, se usa un
55 dispositivo microfluídico para estirar moléculas de ADN en un flujo de alargamiento que se acopla a un sistema de detección multicolor que puede detectar sensibilidad de un fluoróforo individual. Se etiquetan moléculas de ADN bicatenario en los sitios de motivo específico de secuencia con etiquetas de bisPNA (ácido nucleico peptídico) fluorescentes. Entonces se estiran las moléculas de ADN en el dispositivo microfluídico y se conducen en una corriente de flujo hasta detectores de fluorescencia confocal. DLA puede proporcionar las ubicaciones espaciales de
60 motivos de secuencia específicos múltiples a lo largo de moléculas de ADN individuales, y pueden analizarse miles

de moléculas individuales por minuto.

Pueden prepararse una configuración de microchip y condiciones de funcionamiento según esta publicación que son adecuadas para estirar ADN de 50 kb de largo. El chip incluye un campo posterior, un embudo con una razón de reducción de cono de 10:1, una forma de cono que proporciona un perfil $W(x)1/x^2$ (W es la anchura del canal, y x es la coordenada a lo largo de la dirección de flujo), y un canal de interrogación de $5 \mu\text{m}$ de ancho. El canal de interrogación tiene una sección transversal uniforme para garantizar una velocidad de disolución constante, que era de 10-15 $\mu\text{m}/\text{mseg}$. Una vez dentro del canal, las moléculas de ADN estiradas y etiquetadas viajan a través de puntos de luz láser enfocada que excitan la fluorescencia. La epi-iluminación de la muestra y la detección confocal se disponen en el interior de un microscopio de fluorescencia.

Los haces de láser de excitación se dirigen al objetivo de microscopio con un espejo dicróico que refleja la luz con longitudes de onda de 532 nm (haz ExI) y 633 nm (haces ExII y ExIII), pero que es transparente a la emisión de fluorescencia excitada por estos haces. La emisión se divide adicionalmente mediante otro espejo dicróico y filtros de paso de banda. La fluorescencia excitada por el láser de color verde se suministra mediante fibra óptica al fotodiodo de avalancha de recuento de fotones (APD) para la detección de la señal en el canal de datos 1. La fluorescencia excitada mediante los haces rojos ExII y ExIII se dirige a los APD de los canales de datos 2 y 3, respectivamente.

El dispositivo descrito anteriormente puede configurarse con longitudes de paso más grandes con el fin de acomodar hebras de ADN más grandes, presumiblemente hasta longitudes de cromosoma completos. La muestra genómica se estudia con sonda con una sonda específica del cromosoma 21 enroscada a través del canal de interrogación, y se detecta la presencia de uno o más cromosomas.

D. Evaluación cuantitativa

La PCR digital permite la detección de aneuploidía meramente contando transcritos, tal como se ilustra mediante el siguiente cálculo. Suponiendo que el ADN fetal está presente en la sangre materna a un nivel de fracción de ϵ , y que está intentándose descubrir una aneuploidía de orden α en relación con euploidía e (en el ejemplo que se refiere a la detección de síndrome de Down en seres humanos, $e=2$ es euploidía y la trisomía del síndrome de Down $\alpha=3$). Si el cromosoma A es euploide y representa un control interno, y el cromosoma B es aneuploide y es la diana que va a medirse, entonces pueden amplificarse segmentos representativos de ambos cromosomas mediante PCR digital. Al comparar los amplicones de cada tipo, se espera encontrar que para cada e amplicones del cromosoma A haya $e(1-\epsilon)+\alpha\epsilon$ amplicones del cromosoma B. En el caso de una trisomía y $\epsilon = 3\%$, entonces para cada 2 amplicones del cromosoma A se esperan 2,03 amplicones del cromosoma B. Aunque esta diferencia es pequeña, puede medirse. Por ejemplo, si se amplifica una muestra a partir de 1.000 equivalentes de células, entonces pueden esperarse 2.000 amplicones del cromosoma A y 2.030 del cromosoma B. La diferencia de 30 amplicones es, en principio, detectable.

El requisito de confianza estadística para resolver la diferencia en proporciones puede estimarse tal como sigue. Existe una variación estadística aleatoria asociada con el tamaño de muestra inicial, que corresponde aproximadamente a la raíz cuadrada del número de muestras tomadas. De hecho, a menudo es difícil empezar de manera precisa con un número fijado de equivalentes de células, y en el ejemplo previo se espera un error estadístico del orden de 32 amplicones ($32 \sim \text{raíz cuadrada de } 1.000$) para la mayoría de las técnicas de preparación de muestras. Este es el mismo tamaño que la señal que se intenta detectar y por tanto en la práctica se requieren más de 1000 equivalentes de células para una detección robusta. De manera precisa, cuántos se requieran depende de la certeza estadística que se requiera. Si se desea un resultado que sea significativo para k desviaciones estándar, entonces

$$k\sqrt{N} = N(e(1-\epsilon)+\alpha\epsilon - e) = N\epsilon(\alpha-e)$$

$$N = (k/(\epsilon(\alpha-e)))^2$$

Usando los valores del ejemplo previo, si se requieren $k = 3$ desviaciones estándar, entonces el número de amplicones N debe ser de al menos 10.000 para la detección de síndrome de Down. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, el número de secuencias diana que se necesitan para la confianza estadística puede reducirse usando secuencias de control y, además, la muestra puede enriquecerse en ADN fetal.

III. Aplicaciones específicas

La presente invención está adaptada particularmente a la detección de anomalías genéticas que implican diferencias cuantitativas entre secuencias genéticas maternas y fetales. Estas anomalías genéticas incluyen mutaciones que pueden ser heterocigotas y homocigotas entre ADN fetal y materno, y aneuploidías. Por ejemplo, una copia que falta del cromosoma X (monosomía del cromosoma X) da como resultado síndrome de Turner, mientras que una copia adicional del cromosoma 21 da como resultado síndrome de Down. Otras enfermedades tales como síndrome de

Edward y síndrome de Patau están provocadas por una copia adicional del cromosoma 18 y del cromosoma 13, respectivamente. El presente método puede usarse para la detección de una traslocación, adición, amplificación, transversión, inversión, aneuploidía, poliploidía, monosomía, trisomía, trisomía del cromosoma 21, trisomía del cromosoma 13, trisomía del cromosoma 14, trisomía del cromosoma 15, trisomía del cromosoma 16, trisomía del cromosoma 18, trisomía del cromosoma 22, triploidía, tetraploidía, y anomalías de los cromosomas sexuales incluyendo pero sin limitarse a XO, XXY, XYY y XXX.

Otros cebadores específicos de cromosomas se dan a conocer en la solicitud de patente estadounidense 20050164241 concedida a Hahn, Sinuhe, *et al.*, publicada el 28 de julio de 2005, titulada "Detección no invasiva de rasgos genéticos fetales" ("*Non-invasive detection of fetal genetic traits*"), que describe métodos de preparación de muestras y determinados cebadores de PCR, descritos tal como sigue:

Los cebadores para los genes se preparan en base a las secuencias de nucleótidos obtenidas de bases de datos tales como GenBank, EMBL y similares. Los nombres de los cebadores polimórficos y las secuencias de los cebadores para los genes se mostrarán para los cromosomas respectivos en los siguientes ejemplos (n.º 2, ejemplo 1; n.º 4, ejemplo 6, n.º 14, ejemplo 9; n.º 22, ejemplo 2). Los siguientes marcadores genéticos y marcadores polimórficos (pares de cebadores STS polimórficos: D2S207, D2S 177, D2S 156 y D2S 159, BIOS Laboratories, Inc.) se usan para identificar el cromosoma n.º 2.

Existen más de 1.000 conjuntos de cebadores de PCR específicos para el cromosoma 21 enumerados en el sitio web UniSTS de los NIH, que puede localizarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists> y encontrarse con la frase de búsqueda "human [organism] AND 21 [chr]". UniSTS es una base de datos exhaustiva de sitios etiquetados por la secuencia (STS) derivados de mapas basados en STS y otros experimentos. Los STS se definen mediante pares de cebadores de PCR y están asociados con información adicional tal como posición genómica, genes y secuencias. De manera similar, pueden encontrarse secuencias de cebadores para otros cromosomas humanos modificando apropiadamente la consulta de búsqueda.

Los ejemplos de enfermedades en las que la secuencia diana puede existir en una copia en el ADN materno (heterocigoto) pero provocar una enfermedad en un feto (homocigoto) incluyen anemia falciforme, fibrosis quística, hemofilia y enfermedad de Tay Sachs. Por consiguiente, usando los métodos descritos en el presente documento, pueden distinguirse genomas con una mutación de genomas con dos mutaciones.

La anemia falciforme es una enfermedad recesiva autosómica. El nueve por ciento de las personas de raza negra en los EE.UU. son heterocigotos, mientras que el 0,2% son homocigotos recesivos. El alelo recesivo provoca una sustitución de un único aminoácido en las cadenas beta de la hemoglobina.

La enfermedad de Tay-Sachs es una enfermedad recesiva autosómica que da como resultado la degeneración del sistema nervioso. Los síntomas se manifiestan tras el nacimiento. Los niños homocigotos recesivos para este alelo rara vez sobreviven pasados los cinco años de edad. Los pacientes carecen de la capacidad para sintetizar la enzima N-acetil-hexosaminidasa, que descompone el lípido gangliósido GM2.

Otro ejemplo es la fenilcetonuria (PKU), un trastorno heredado recesivo cuyos pacientes carecen de la capacidad para sintetizar una enzima para convertir el aminoácido fenilalanina en tirosina. Los individuos homocigotos recesivos para este alelo tienen una acumulación de fenilalanina y productos de descomposición anómalos en la orina y la sangre.

La hemofilia es un grupo de enfermedades en la que la sangre no se coagula normalmente. Están implicados en la coagulación factores en la sangre. Se dice que los hemofílicos que carecen del factor VIII normal tienen hemofilia A y los que carecen del factor IX tienen hemofilia B. Estos genes se portan en el cromosoma X, de modo que pueden usarse cebadores y sondas en el presente método para detectar si un feto heredó o no el cromosoma X defectuoso de la madre, o el alelo normal del padre.

Se encuentra un listado de mutaciones génicas para las que puede adaptarse el presente método en <http://www.gdb.org/gdb>, la base de datos del genoma humano GDB (*Human Genome Database*), la base de datos mundial oficial para la anotación del genoma humano (*The Official World-Wide Database for the Annotation of the Human Genome*) que tiene su sede en RTI International, Carolina del Norte, EE.UU.

A. Preparación para detectar trisomía con análisis de frecuencia

En este protocolo, se usa el número de muestras de reacción positivas, independientemente del aumento de intensidad de tres frente a dos cromosomas en una muestra de reacción. Es decir, tal como se describió anteriormente, puede detectarse una trisomía o bien buscando un aumento de señal de un pocillo individual que tienen múltiples copias de ADN cromosómico o bien diluyendo una muestra y contando la frecuencia de respuestas del marcador trisómico frente a un marcador diploide de control.

El ADN de feto que circula en plasma materno se usa en este caso para proporcionar suficiente material para el análisis cromosómico. Se extrae ADN de una muestra de sangre y se alicuota en diferentes cámaras de reacción basándose en equivalentes de genoma, es decir, el contenido genómico completo de un célula normal individual (46

- 5 cromosomas). Esto pesa aproximadamente 6,6 pg. El término “equivalente de genoma nominal” se usa para referirse a la distribución calculada de ADN de muestra basada en un peso de ADN y tamaño de genoma calculado. En la práctica, habrá algunas variaciones experimentales en el tamaño de la muestra de ADN y, debido a una distribución de fragmentos aleatoria, un equivalente de genoma dado no contendrá exactamente los fragmentos de ADN correspondientes sólo a un genoma diploide completo individual, pero un gran número, en promedio, sí.
- 10 Para cada panel en el chip de matriz digital, se requieren 10 ul de mezcla de reacción. Para lograr que se llene ~1/3 del panel, la concentración final requerida de molde en la mezcla de reacción debe ser de aproximadamente 48 copias/μl (cada 0,33 moldes por 7 nl de cámara). Por tanto para un volumen de reacción de 10 μl (1 panel), se requieren 480 copias (~240 equivalentes de genoma, “GE”) de ADN flotante libre total. Estos cálculos se basan en Chiu *et al.*, “Effects of Blood-Processing Protocols on Fetal and Total DNA Quantification in Maternal Plasma”, *Clinical Chemistry*, 47:9. 1607-1613. 2001, en el que se usa PCR cuantitativa en tiempo real para estimar el ADN plasmático aislado en diferentes protocolos, y Li Y, Zimmermann *et al.*, “Size Separation of Circulatory DNA in Maternal Plasma Permits Ready Detection of Fetal DNA Polimorphisms”, *Clinical Chemistry*, 50: 6,1002-1011. 2004.
- 15 Suponiendo que el 55% del volumen sanguíneo es plasma, puede obtenerse una recuperación del 80% de la extracción en gel con una preparación de ADN tal como con un kit QIAEX II. Si se recogen 20 ml de sangre, el volumen de plasma = 20 ml de sangre * 0,55 = 11 ml. El ADN flotante libre total = 11 ml * 1000 GE/ml = 11000 GE. Por tanto, puede calcularse la cantidad de ADN < 300 pb, porque 11000 GE * 0,27 = 2970 GE. La cantidad de ADN <300 pb tras la recuperación = 2970 GE * 0,8 = 2376 GE = 4752 copias.
- 20 Por tanto, una extracción de sangre de 20 ml debe contener suficiente ADN total inferior a 300 pb (que es ADN fetal aproximadamente al 85%) para aproximadamente 10 paneles, suficiente, tal como se muestra a continuación, para lograr significancia estadística.
- B. Protocolo de muestra
- El siguiente protocolo de muestra proporciona un procedimiento para su uso en la preparación de una muestra de plasma materno y el aumento de la señal del cromosoma 21.
- 25 Recogida de plasma: recoger 20 ml de sangre periférica del sujeto en gestación. Ésta se recoge en 2 tubos con EDTA como anticoagulante. Procesar la sangre en el plazo de 2 horas de la recogida de la muestra. En primer lugar, se procesa la sangre mediante centrifugación a 1600 g durante 10 min. Se alicuota plasma en tubos de polipropileno (1 ml cada uno), con cuidado de no alterar la fase de capa leucocítica. A continuación, se microcentrifuga el sobrenadante a 16000 g (velocidad máxima) durante 10 min. para eliminar células maternas residuales. Entonces,
- 30 se extrae ADN del plasma con el kit QIAamp Blood Mini (“protocolo de líquido corporal”). Se aplican 800 μl de plasma por columna y se eluyen en 40 μl de tampón.
- 35 Dependiendo de la concentración de ADN real en plasma, puede necesitarse procesar todo el plasma en una columna individual (con kit Mini o Maxi) para lograr una concentración final superior de ADN. Entonces, se somete el ADN a electroforesis en gel (Li *et al* Clin. Chem. 50:6 1002-1011 2004) para separar los fragmentos de ADN de tamaño más pequeño. Se preparara una bandeja de gel UV con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio 0,5 mg/l. Se usan un marcador de tamaño molecular de 100 pb y ADN de fago lambda digerido con HindIII como marcadores. Se carga ADN en un gel; se ejecuta el gel a 80 V durante 1 hora. Se extrae el ADN del gel cortando en primer lugar ADN <300 pb con una cuchilla limpia. Se recupera esta banda con kit de extracción de gel QIAEX II (Qiagen) y se eluye con 40 ul en tampón de elución.
- 40 Cuantificación de ADN total con PCR en tiempo real:
- La cantidad de ADN flotante libre total puede cuantificarse usando cebadores y sonda de Taqman diseñados para el gen de GAPDH (cromosoma 12). Se ejecuta la PCR en tiempo real con cebadores y sondas de GAPDH y amiloide (cromosoma 21) antes de ejecutar con matriz digital para confirmar que las regiones de amplificación están intactas. Para aumentar la señal del cromosoma 21, puede usarse un conjunto adicional de cebadores y sondas.
- 45 Un posible candidato es el siguiente (véase Blood 104(1):149-158 (2004):
- DSCR1 (región crítica 1 del síndrome de Down) Cr 21
- SEQ ID NO: 6: 5’ (sonda) -AGG TTG TGA AAA CAG CAG CAA TGC AAT GT- (extintor) P3’
- Directo: (SEQ ID NO: 7) 5’ CCA CAG GAA GCC GCC TAG T 3’
- Inverso: (SEQ ID NO: 8) 5’ TGA GGG AAG AAA GGA AAC GCT 3’
- 50 Región de amplificación (con cebadores subrayados) SEQ ID NO: 9):
- CCACAGGAAGCCGCCTAGTGCAGAGAGGTTGTGAAAACAGCAGCAATGCAATGTGG
AAATTGTAGCGTTTCCTTTCTTCCCTCA. Puede diseñarse un conjunto adicional de cebadores y sondas para

aumentar la señal del control (estos cebadores pueden ser para el cromosoma 12 o cualquier otro cromosoma excepto el cromosoma 21).

Si se usa un dispositivo microfluídico automatizado, se proporcionan canales y válvulas apropiados para la introducción de reactivos de PCR y, si se usa, una sonda.

5 En los ejemplos a continuación, se usó un chip DID prototipo de Fluidigm. El chip de aislamiento y detección digital (DID) funciona repartiendo una mezcla de muestra/ensayo (ensayos TaqMan®) en de cientos a decenas de miles de cámaras de reacción, en las que se monitorizan de manera continua reacciones de QPCR en tiempo real mediante un lector de matriz dinámico. El chip DID descrito en el presente documento contiene entradas para 12 mezclas de muestra /ensayo, y su arquitectura reparte 7,5 µl de fluido para cada entrada en 1.200 cámaras de reacción. Éstas se muestran como 12 paneles en las figuras 2 y 3. Se usa instrumentación para conducir las mezclas de muestra/ensayo desde los pocillos en el portador al interior de las cámaras de reacción apropiadas. Tal como se muestra en las figuras 2 y 3, los puntos blancos indican la ubicación de cámaras de reacción positivas para el cebador y colorante indicado. La suma de los pocillos positivos en cada sección concordará con la copias de gen/cromosoma que se midieron en la muestra. El número de puntos de luz mostrados representa el número de cámaras de reacción positivas; no se usó cuantificación en estos experimentos, y los resultados no dependen de la cuantización de una señal a partir de una mezcla de muestras individuales (diferenciadas). Puede usarse tal cuantización, pero también puede ser una fuente de error en métodos que dependen de ésta.

20 Este chip se describe adicionalmente en Ottesen *et al.*, "Microfluidic Digital PCR Enables Multigene Analysis of Individual Environmental Bacteria", Science 314:1464-1467 (1 de diciembre de 2006). Tal como se indica en el mismo, la muestra de ADN se suspende en un tampón de reacción de PCR y se carga en el dispositivo microfluídico. El presente trabajo se realizó en una versión más reciente de ese dispositivo microfluídico. Este dispositivo se describe adicionalmente a continuación. Como alternativa al protocolo anterior, puede usarse un kit con reactivos preoptimizados, tales como el kit de PCR múltiple QuantiTect de Qiagen, que contiene tampón de PCR múltiple QuantiTect, que tiene factor sintético de MP y una combinación optimizada de KCl y (NH₄)₂SO₄, que promueve el apareamiento específico y estable de cebadores con moldes. Este kit también contiene HotStarTaq ADN Polimerasa: Puesto que esta polimerasa requiere incubación a 95°C para su activación, no se forman productos cebados incorrectamente ni dímeros de cebador, que pueden competir por los reactivos, durante el establecimiento de la reacción.

También se usan los siguientes procedimientos anticontaminación:

- 30 1. Usar puntas de pipeta resistentes a aerosoles
2. Tratamiento de amplificación previa mediante el uso de uracilo N-glicosilasa, que destruyó ARN/productos de PCR que contenían uracilo
3. Blanco de agua negativo
4. Cortes de gel de blanco negativos
- 35 5. Panel de control negativo en matriz digital

Tras la extracción de la sangre y la purificación, la concentración preferida de la muestra de ADN debe ser de ~140-240 copias/µl, es decir, ~70-120 GE/µl. Esto corresponde a de ~3,4 a 2 µl de volumen de molde requerido en un volumen de reacción de PCR digital de 10 µl.

40 En este protocolo y los siguientes ejemplos, la mezcla de material genético materno y fetal obtenida a partir de la madre se diluye para lograr una alta probabilidad de que sólo una secuencia diana estará presente en una muestra dada que va a analizarse. Tal como se muestra en la figura 1A, también es posible llevar a cabo este procedimiento con menos dilución y menos sitios de muestra vacíos si se usa la cuantificación para distinguir varias secuencias diana en una muestra.

IV. Ejemplos

45 A continuación se presentan los datos obtenidos a partir de ADN genómico extraído de una línea celular humana normal y de una línea celular humana de síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21). Estas líneas celulares se adquirieron de la ATCC. Se adaptaron cebadores de PCR de Taqman específicos para el cromosoma 21 y el cromosoma 12 a partir de una referencia: Zimmermann B *et al.*, "Novel Real-Time Quantitative PCR Test for Trisomy 21". Clinical Chemistry. 48 (n.º 2). 2002. 362-363. HEX (hexacloro-6-carboxifluoresceína) y FAM (6-carboxifluoresceína) son colorantes fluorescentes bien conocidos; el extintor BHQ® es un colorante extintor de agujero negro (BHQ, Biosearch Technologies, Novato, CA).

Se sintetizaron los cebadores y las sondas

Amiloide directo: 5' GGG AGC TGG TAC AGA AAT GAC TTC 3' (SEQ ID NO: 11)

Amiloide inverso: 5' TTG CTC ATT GCG CTG ACA A 3' (SEQ ID NO: 12)

Sonda de amiloide: 5' (FAM) AGC CAT CCT TCC CGG GCC TAG G (BHQ)3' (SEQ ID NO: 13)

GAPDH directo: 5' CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC 3'(SEQ ID NO: 14)

GAPDH inverso: 5' CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT 3' (SEQ ID NO: 15)

5 Sonda de GAPDH: 5' (HEX)AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC (BHQ)3' (SEQ ID NO: 16) por IDT (Integrated DNA Technologies). Se analizaron muestras de ADN mediante PCR digital usando PCR digital microfluídica en un chip microfluídico Fluidigm® que tenía 12 paneles con 765 (pocillos) particiones cada uno. Se analizaron diversas mezclas de ADN normal y de síndrome de Down (que representan una mezcla de células fetales y maternas en una muestra de sangre). Se pipetearon pequeñas cantidades de cada molde directamente en cada mezcla de PCR; alternativamente, en primer lugar podría prepararse una mezcla de moldes, después pipetearse en la mezcla de PCR, lo que debería proporcionar resultados más precisos. Se usó el método alternativo en estos experimentos. En estos ejemplos, se detecta trisomía basándose en el número de pocillos que muestran el marcador cromosómico triplicado, es decir, el análisis ilustrado en la figura 1C. No se usan datos de intensidad del cromosoma triplicado, excepto como una razón con respecto a un marcador cromosómico normal. Debido a que la muestra está diluida, muchos de los pocillos no tendrán cromosoma de interés (o fragmento marcador), tal como puede observarse en las figuras 2 y 3, que muestran fotografías de chips del ejemplo 2.

Protocolo: combinar cebadores 300 nM; sondas 150 nM; supermezcla iTaq con supermezcla ROX o iQ. Tween 20 (0,1%); molde de ADN (2 µl, premezclado con el porcentaje deseado de ADN de síndrome de Down); agua (rellenar hasta un volumen de reacción total de 10 µl).

20 Se cargó cada panel con mezcla de reacción de 10 µl, y se realizó PCR en un termociclador similar al sistema BIOMARK disponible comercialmente de Fluidigm según las instrucciones del fabricante. Las condiciones de ciclado fueron: 98°C 30 s, 97°C 30 s, 95°C 2 min., [56°C 30 s, 58°C 30 s, 60°C 30 s, 98°C 15 s] x 40 ciclos, 60°C durante 10 min.

25 Se escribió un programa MATLAB para restar la imagen del chip tomada antes del ciclado de la tomada en el ciclo 40 para cada canal fluorescente. Se contó el número de pocillos positivos en cada canal fluorescente.

Se realizaron experimentos con muestras que contenían un 100% de ADN de síndrome de Down, un 60% de ADN de síndrome de Down, un 50% de ADN de síndrome de Down, un 40% de ADN de síndrome de Down, un 30% de ADN de síndrome de Down y un 0% de ADN de síndrome de Down (es decir, 100% normal). Se muestran los resultados de estos experimentos en la figura 4, en la que cada barra y cada punto representan a una concentración diferente de ADN de síndrome de Down.

30 Se analizaron los datos a partir de los datos tal como sigue:

X^* =número de recuentos de HEX (cromosoma 12)

Y^* =número de recuentos de FAM (cromosoma 21)

35 Hay una respuesta característica para PCR digital. A bajo número de copias, tal como se describe adicionalmente en Warren L, Bryder D, Weissman IR, Quake SR. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. Véase, PNAS 2006. 103: 17807-17812).

X =número de copias de entrada real del cromosoma 12

Y =número de copias de entrada real del Cromosoma 21

$X = \log(1 - X^*/N) / \log(1 - 1/N)$

40 $Y = \log(1 - Y^*/N) / \log(1 - 1/N)$

N =número total de partición por panel = 765

Intervalo de confianza $k = (Y - X) / \sqrt{Y}$

45 En la figura 4, se representó gráficamente el nivel de confianza obtenido para un único chip frente al porcentaje de ADN de síndrome de Down y se comparó con el nivel de confianza pronosticado (línea). El intervalo de confianza observado a, por ejemplo un 30% de ADN, era inferior al pronosticado, pero no obstante mostró un intervalo de confianza de >1 para sólo un panel.

Se realizó este cálculo tal como sigue:

Para 1 equivalencia genómica,

número de copias del cromosoma 12 = $2(1-\varepsilon) + 2\varepsilon = 2$

número de copias del cromosoma 21 = $2(1-\varepsilon) + 3\varepsilon = 2+\varepsilon$

diferencia entre el número de copias de Cr21 y Cr12 = ε

en el que $\varepsilon = \text{ADN fetal}/\text{ADN flotante libre total} * 100\%$

5 Para m equivalencias genómicas

Y=número de copias del cromosoma 21

X=número de copias del cromosoma 12

diferencia entre el número de copias de Cr21 y Cr12 = $D = Y-X = m\varepsilon$

$D=k\sigma_Y = k*\text{sqrt}(Y)$, suponiendo que la distribución de Y sigue la de Poisson (media = desviación estándar = Y)

10 $k=m \varepsilon/\text{sqrt}(Y)$

$m=Y/(2 + \varepsilon)$

$k=\text{sqrt}(Y)* \varepsilon/(2 + \varepsilon)$

Si se usa 1/3 del panel (es decir, 1 compartimiento positivo en cada 3 compartimientos)

N=número de compartimientos

15 $Y^*=N/3$

$Y=\log(1-Y^*/3)/\log(1-1/N) = \log(2/3)/\log(1-1/N)$

k varía con N tal como se muestra en el gráfico.

20 El intervalo de confianza k corresponde a la desviación estándar, en el que una desviación estándar superior indica una mayor diferencia entre el ADN normal y de síndrome de Down. Incluso a la concentración más baja usada (30%) y con sólo 10 paneles analizados, el análisis estadístico mostró la viabilidad del presente método.

25 Las figuras 2 y 3 muestran resultados de muestras con un 100% ADN de síndrome de Down, para facilidad de análisis visual. En cada panel, el número de puntos indica los pocillos positivos para los marcadores sometidos a prueba. Puede observarse que el cromosoma 21 tiene más puntos mediante simple observación visual, distinguiendo el cromosoma trisómico del normal. En una mezcla del 30% (que representa una muestra de sangre materna enriquecida), se analizaron los resultados estadísticamente.

La tabla 1 a continuación muestra los resultados para cada panel (numerados como en las figuras 2 y 3) en un único experimento usando un 30% de ADN de síndrome de Down.

Tabla 1

Panel	Muestra	FAM	HEX	Razón
1	Normal	221	213	1,04
2	Normal	254	264	0,96
3	Normal	271	252	1,08
4	Normal	246	257	0,96
5	Normal	241	238	1,01
8	30% de ADN de síndrome de Down	270	222	1,22
9	30% de ADN de síndrome de Down	219	194	1,13
10	30% de ADN de síndrome de Down	249	234	1,06
11	30% de ADN de síndrome de Down	230	223	1,03
12	30% de ADN de síndrome de Down	216	189	1,14

30 La columna "FAM" muestra los compartimientos (pocillos) positivos para el cromosoma 21, y la columna "HEX" muestra los compartimientos positivos para el cromosoma 12. Se muestra la significación de las razones superiores en los casos de síndrome de Down en la figura 4, y también se analizó en una prueba de la T de Student, con un valor de 0,036599344.

El análisis anterior muestra que la fiabilidad estadística del presente método puede mejorarse drásticamente simplemente aumentando el número de pocillos sometidos a prueba. Puesto que se requieren aproximadamente

240 equivalentes de genoma por panel, y se encuentran aproximadamente 4.700 equivalentes de genoma en una muestra de 20 ml, es posible, dada la presente descripción, simplemente ejecutar análisis adicionales para aumentar la significación estadística.

Lista de secuencias

5	<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY	
	<120> EXAMEN GENÉTICO NO INVASIVO MEDIANTE ANÁLISIS DIGITAL	
	<130> 3815.16-1 PCT	
10	<140>	
	<141>	
	<160> 16	
15	<170> PatentIn ver. 3.3	
	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
25	<400> 1	
	gggagctggt acagaaatga cttc	24
	<210> 2	
	<211> 22	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
35	<400> 2	
	agccatcctt cccgggccta gg	22
	<210> 3	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 3	
	ccccacacac atgcacttac c	21
50	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 4	
60	cctagtccca gggctttgat t	21
	<210> 5	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

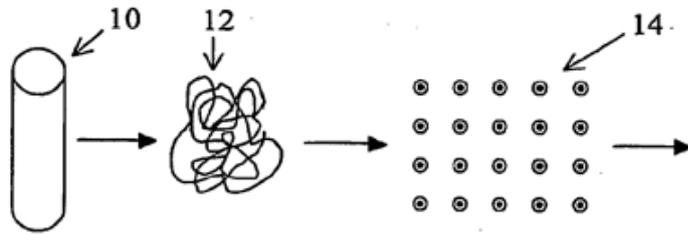
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
5	<400> 5 aaagagctag gaaggacagg caactggc	29
	<210> 6 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética	
15	<400> 6 aggtgtgaa aacagcagca atgcaatgt	29
	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
25	<400> 7 ccacaggaag cgcctagt	19
	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
35	<400> 8 tgagggaaga aaggaaacgc t	21
	<210> 9 <211> 84 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
45	<400> 9 ccacaggaag cgcctagtg cagagaggtt gtgaaaacag cagcaatgca attgtggaat tgtagcgttt ccttctcc ctca	60 84
	<210> 10 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
55	<400> 10 ttgctcattg cgctgacaa	19
	<210> 11 <211> 24 <212> ADN	
60		
65		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 11	
	gggagctggt acagaaatga cttc	24
10	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 12	
	ttgctcattg cgctgacaa	19
20	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 13	
30	agccatcctt cccgggccta gg	22
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 14	
40	ccccacacac atggcactta cc	22
	<210> 15	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
50	<400> 15	
	cctagtccca gggcttgat t	21
	<210> 16	
55	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético	
60	<400> 16	
	aaagagctag gaaggacagg caacttggc	29
65		

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de aneuploidía fetal en una mezcla de material genético materno y fetal, en una muestra de tejido materno, caracterizado por:
 - 5 (a) distribuir el material genético en muestras de reacción, en las que el ADN que va a analizarse estará o bien presente o bien ausente en una muestra de reacción, debido a variaciones aleatorias entre muestras de reacción;
 - 10 (b) medir la presencia de diferentes secuencias diana en las muestras de reacción mediante análisis digital para obtener resultados binarios que proporcionan la detección diferencial de las secuencias diana en una mezcla de material genético materno y fetal, en el que dichas secuencias diana comprenden secuencias de dos cromosomas, uno de los cuales es posiblemente aneuploide y uno de los cuales es presumiblemente diploide;
 - 15 (c) analizar los resultados binarios de la etapa (b) contando la frecuencia de respuestas positivas a partir de secuencias diana seguido por
 - (d) análisis estadístico de los resultados de la etapa (c) mediante lo cual la frecuencia de respuestas positivas a partir de secuencias diana proporciona datos suficientes para distinguir secuencias diana euploides de aneuploides.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de medición comprende la secuenciación directa del material genético materno y fetal.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que una de las diferentes secuencias diana es diploide en material genético materno y aneuploide en material genético fetal y otra de las diferentes secuencias diana es diploide en material genético tanto materno como fetal.
4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el tejido materno es plasma sanguíneo o sangre periférica materna.
5. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el número de muestras de reacción es de al menos aproximadamente 10.000 y/o en el que el material genético es ADNc derivado de ARN en el tejido.
6. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las muestras de reacción se seleccionan del grupo que consiste en: pocillos en una placa de microtitulación, fases acuosas en una emulsión, una zona sobre una superficie de matriz y cámaras de reacción en un dispositivo microfluídico.
7. Método según la reivindicación 1, en el que las muestras de reacción se ponen en contacto con una pluralidad de cebadores de PCR, incluyendo al menos un cebador dirigido específicamente a una secuencia materna y al menos un cebador dirigido específicamente a una secuencia fetal, y que incluye además la etapa de amplificar la secuencia materna y la secuencia fetal.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha medición comprende la hibridación de una secuencia diana con un ácido nucleico que tiene un marcador fluorescente.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho ácido nucleico está en una muestra para unirse a una secuencia diana y generar un cambio resultante en la fluorescencia.
10. Método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha medición comprende el uso de ácidos nucleicos específicos para el cromosoma 21 humano y específicos para otro cromosoma humano.
11. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha medición comprende la hibridación con ácidos nucleicos que se hibridan con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en uno o más de los genes: CFTR, factor VIII (gen F8), beta globina, hemocromatosis, G6PD, neurofibromatosis, GAPDH, beta amiloide y piruvato cinasa.
12. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha medición detecta una secuencia delecionada en una deleción de cromosoma humano, movida en una translocación o inversión, o duplicada en una duplicación cromosómica, en el que dicha secuencia se caracteriza en un trastorno genético conocido porque el material genético fetal no está presente en el material genético materno.
13. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha medición detecta una secuencia de una forma mutada de un gen humano que tiene una anomalía conocida.
14. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de enriquecer la mezcla en material genético fetal mediante separación por tamaño, mediante lo cual se usa una preparación que comprende sólo fragmentos de ADN inferiores a aproximadamente 300 pb para medir en la etapa (b).

15. Método según la reivindicación 2, en el que la secuenciación comprende secuenciación de una única molécula.
16. Método según la reivindicación 2, en el que la secuenciación comprende secuenciación masiva en paralelo.
17. Método según la reivindicación 1, caracterizado además por las etapas de:
- 5 a) distribuir la mezcla de material genético materno y fetal en al menos quinientas muestras de reacción separadas, conteniendo cada muestra de reacción menos de aproximadamente una molécula de secuencia diana;
- 10 b) hibridar el ADN en cada muestra de reacción separada con ácidos nucleicos que se hibridan con una de dos diferentes secuencias diana, una de las cuales se usa como secuencia de control en un cromosoma presumiblemente diploide para detectar dianas presentes por igual en ADN tanto materno como fetal y la otra se usa para detectar dianas posiblemente no presentes por igual en ADN tanto materno como fetal en un cromosoma posiblemente aneuploide con el fin de detectar una aneuploidía fetal; y
- 15 c) analizar los resultados de dicho marcaje para obtener resultados que distinguen una diferencia en los números de secuencias diana en el cromosoma presumiblemente diploide y el cromosoma posiblemente aneuploide.
18. Método según la reivindicación 17, en el que la distribución es en al menos 10.000 muestras de reacción separadas, en el que dicha diferencia en secuencias diana es una aneuploidía fetal.
19. Método según la reivindicación 17, en el que la distribución es en al menos 10.000 muestras de reacción separadas, en el que dichas sondas comprenden una sonda específica para el cromosoma 21 humano.
- 20



	1	2	3	4	5
A	21, 21 22, 22		21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22
B	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22
C	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22
D	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22

Fig. 1A

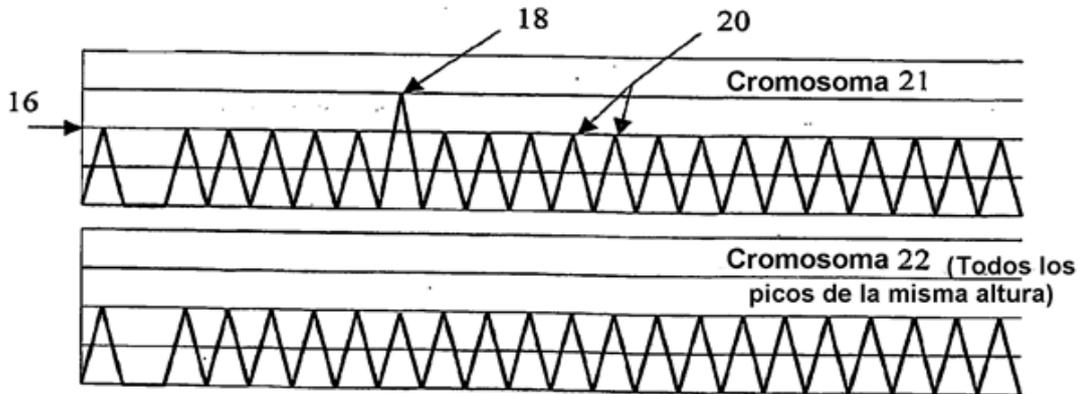


Fig. 1B

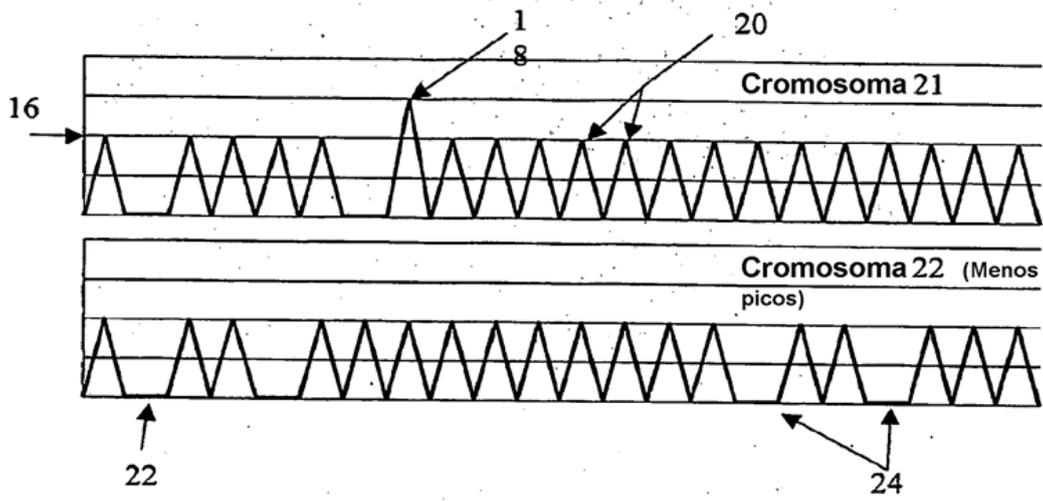
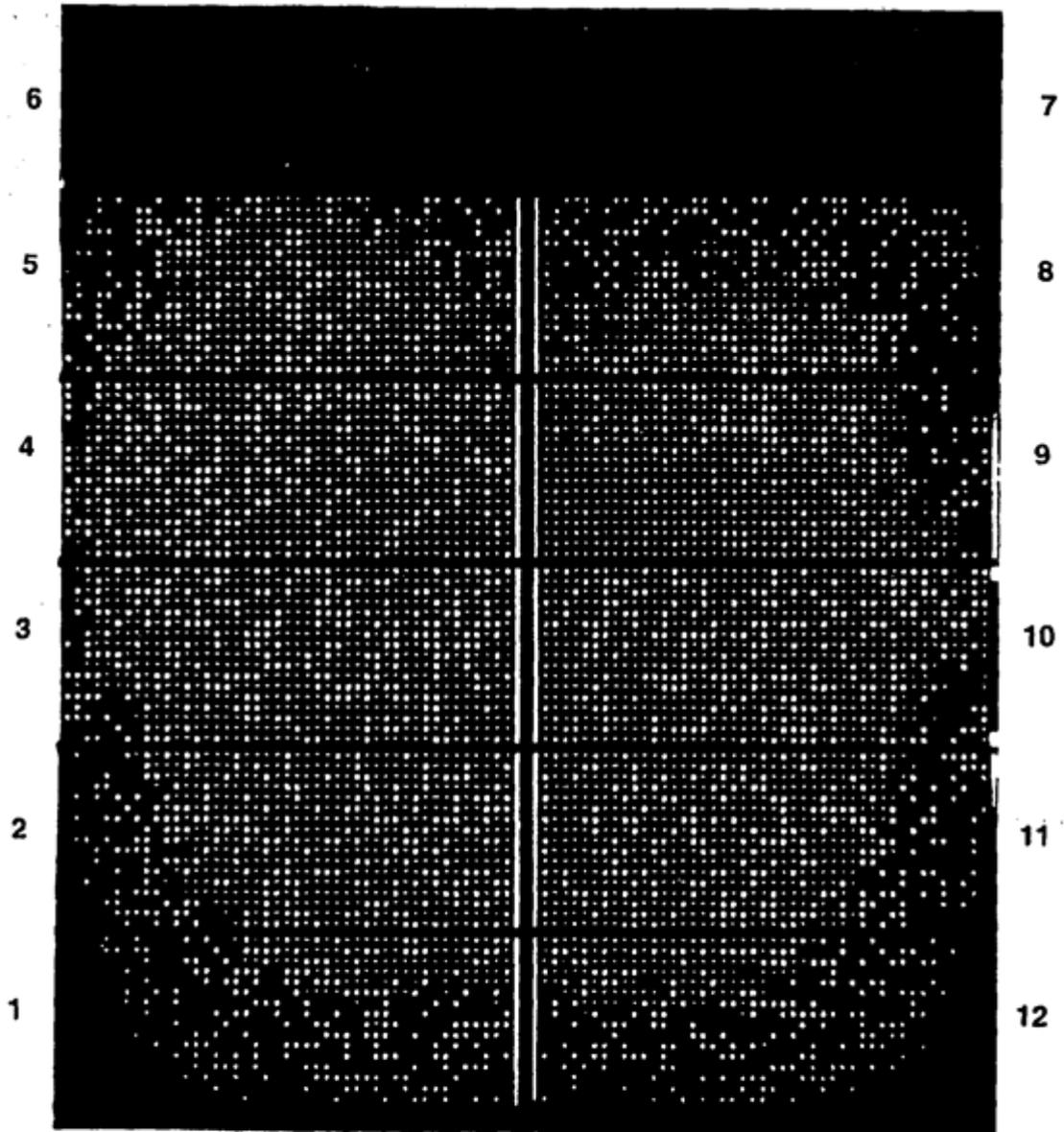
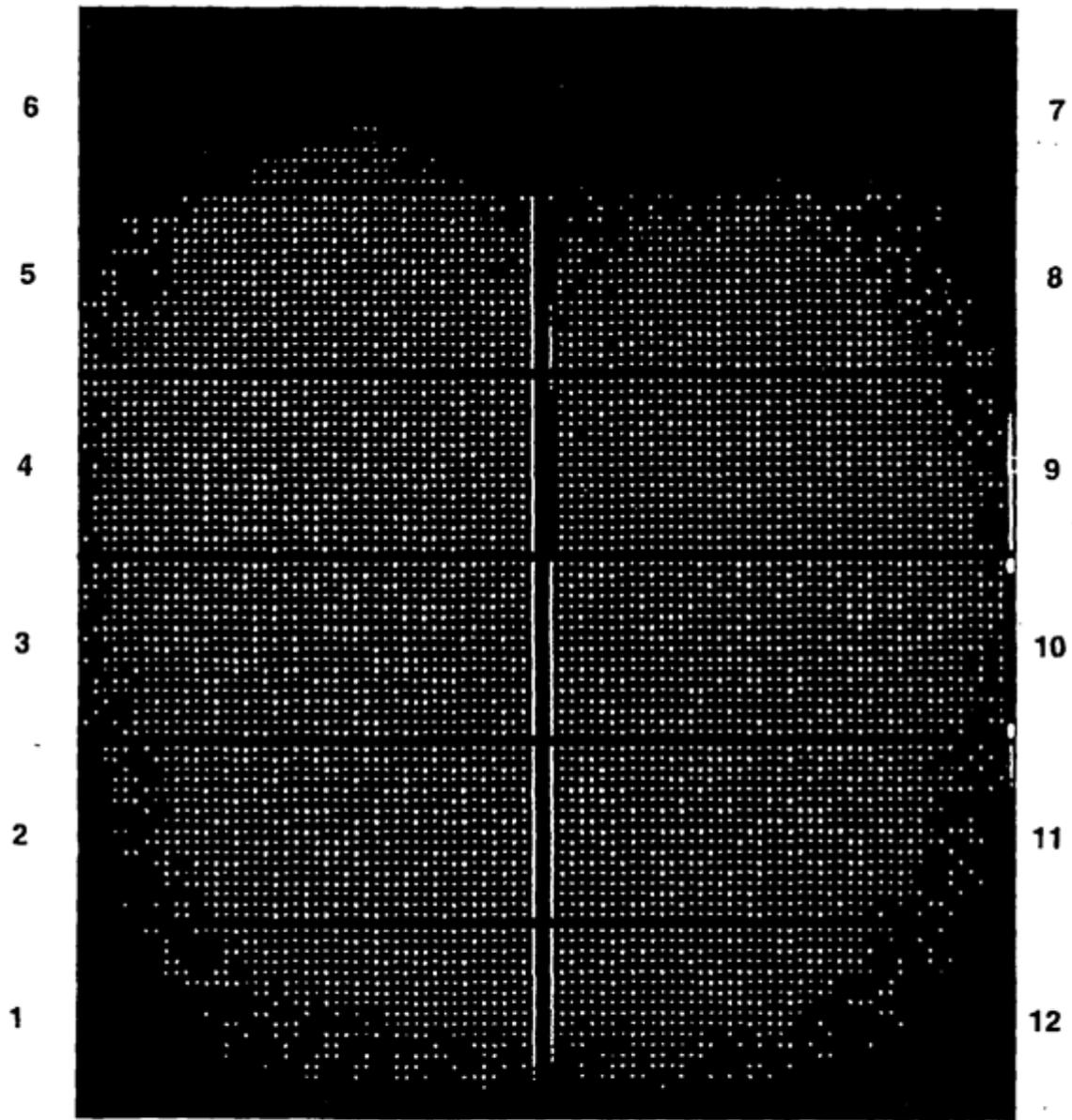


Fig. 1C



FAM de Cr21

Fig. 2



HEX de Cr12

Fig. 3

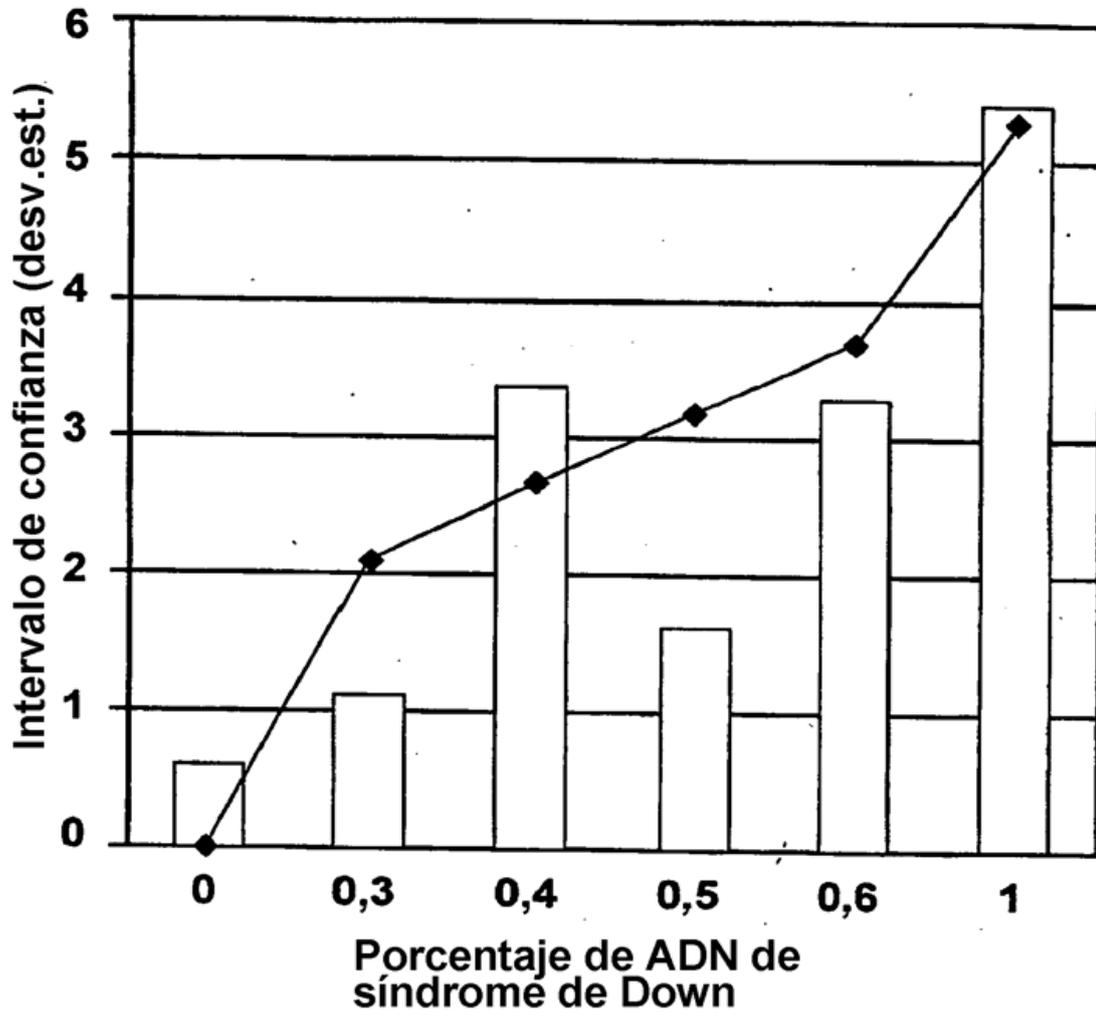


Fig. 4