

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 861**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2010 E 10701193 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2385992**

54 Título: **Enriquecimiento e identificación de células fetales en sangre materna y ligandos para tal uso**

30 Prioridad:

07.01.2009 DK 200900020

04.10.2009 DK 200901084

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

15.04.2015

73 Titular/es:

ARCEDI BIOTECH APS (100.0%)

**Dandyvej 19
7100 Vejle, DK**

72 Inventor/es:

**ECKELT, ANDREAS;
CHRISTENSEN, BRITTA;
KØLVRAA, STEEN;
BRINCH, MARIE;
SINGH, RIPUDAMAN y
HATT, LOTTE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 533 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Enriquecimiento e identificación de células fetales en sangre materna y ligandos para tal uso

Antecedentes

5 El examen de células fetales para la detección temprana de enfermedades fetales y anomalías genéticas se lleva a cabo en relación con muchos embarazos, en particular cuando la edad materna es alta (35 años o más) o cuando se conocen enfermedades genéticas en la familia. Pueden obtenerse células fetales mediante amniocentesis, la extracción de líquido amniótico de la cavidad amniótica dentro del saco amniótico o mediante biopsia coriónica, en la que se toman biopsias de la placenta, denominadas tomas de muestras invasivas.

10 El examen de aneuploidía prenatal emplea o bien análisis de cromosomas tradicional o bien sondas de ADN específicas de cromosoma para el esclarecimiento de aberraciones numéricas de los cromosomas anómalos con mayor frecuencia, en particular de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en el feto.

Debido a la invasividad de los métodos de toma de muestras descritos anteriormente y al riesgo de aborto, sería ventajoso realizar el diagnóstico fetal mediante un procedimiento no invasivo, tal como por ejemplo mediante el uso de una muestra de sangre materna.

15 Durante el embarazo, una variedad de tipos celulares de origen fetal atraviesan la placenta y circulan dentro de la sangre periférica materna. La viabilidad de usar células fetales en la circulación materna para fines de diagnóstico se ha visto obstaculizada por el hecho de que las células fetales están presentes en la sangre materna sólo en números muy limitados, indicándose números de una célula fetal por 10^5 - 10^8 células maternas nucleadas o 1-10 células fetales por ml de sangre materna. Además, la mayoría de las células fetales no pueden distinguirse de las células maternas basándose sólo en la morfología, por lo que se han investigado métodos de identificación de células fetales alternativos.

25 El documento US2007/0015171 describe un método no invasivo para el aislamiento y la detección de ADN fetal. El método enriquece una muestra de sangre materna usando anticuerpos que se unen específicamente a las células maternas y/o anticuerpos que se unen específicamente a las células fetales. Los inventores sugieren el uso de algunos anticuerpos mencionados específicamente: HLe-1 es un anticuerpo que reconoce un antígeno presente sobre leucocitos humanos maduros y sobre precursores de eritrocitos muy inmaduros, pero no en eritrocitos nucleados maduros. Por tanto, se sugiere que puede usarse este anticuerpo para reconocer leucocitos maternos, pero no eritrocitos nucleados fetales. También se sugieren un anticuerpo anti-monocitos (M3) y un anticuerpo anti-linfocitos (L4) para extraer células maternas de una muestra. Finalmente, los autores sugieren usar un anticuerpo monoclonal, que reconoce el receptor de transferrina (TfR) sobre células fetales. Posteriormente se pone a disposición el ADN de células fetales aisladas para la detección y el diagnóstico.

30 El documento WO2006119569 proporciona en el ejemplo 7 un método para el marcaje de células fetales en células de sangre materna fijadas mediante el uso de un anticuerpo anti-telomerasa marcado.

35 Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados de aislamiento de células fetales a partir de muestras de sangre materna tal como para facilitar la detección y el diagnóstico prenatales.

Sumario de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones 1-4.

40 Otro aspecto de la descripción se refiere a métodos de identificación y/o enriquecimiento de células fetales a partir de una muestra de sangre materna usando ARNm expresados preferentemente en células fetales y/o proteínas codificadas por los ARNm. Tales métodos comprenden las etapas de

a. proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma

b. poner en contacto la muestra con

45 i. una sonda de hibridación dirigida a un ácido nucleico que comprende al menos 10 pb de un gen seleccionado del grupo que consiste en TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMG1, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B o

50 ii. un ligando dirigido a un antígeno codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en TMEFF2,

ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGD2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2A, ACVR2B, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B.

Tras el enriquecimiento y/o la identificación, la(s) célula(s) fetal(es) normalmente se somete(n) a una etapa de detección, de manera que pueda realizarse una etapa de predicción y/o diagnóstico del feto.

Descripción

La presente descripción se basa en la identificación de ARNm que codifican para proteínas que se expresan preferentemente en células fetales de una muestra de sangre materna. Es decir, los ARNm están presentes en niveles aumentados en las células fetales en comparación con los niveles de ARNm en células de sangre materna. Por tanto, los ARNm identificados pueden usarse para la identificación de células fetales en una muestra de sangre materna mediante la detección o la cuantificación del ARNm o de la proteína codificada por el ARNm. Cuando se usa el término detección en el presente documento, cubre tanto detección como cuantificación. En dos realizaciones independientes, sin embargo, el término detección cubre o bien detección o bien cuantificación. Generalmente, el experto reconocerá cuándo detección también cubre cuantificación, es decir cuándo es relevante cuantificar los niveles de ARNm o los niveles de la proteína codificada por los ARNm. Esto puede ser necesario, por ejemplo, para la detección de un ARNm dado que se expresa a un nivel bajo en células maternas (pero no está ausente) y cuando el mismo ARNm se expresa por ejemplo a niveles 3 veces superiores en células fetales.

Un subconjunto de los ARNm codifican para proteínas expuestas en la superficie, y estas proteínas pueden usarse como antígenos para ligandos tales como aptámeros o anticuerpos y el uso de estos ligandos permite el enriquecimiento y/o la identificación de células fetales a partir de una muestra de sangre materna. Tal enriquecimiento es deseable porque las células fetales obtenidas de sangre materna pueden usarse para la detección y el diagnóstico prenatales.

Otro descubrimiento que los presentes inventores han hecho es que una etapa de fijación de las células de la muestra materna ayuda enormemente en la identificación y el enriquecimiento de las células fetales a partir de la muestra. Esta etapa de fijación puede realizarse junto con los métodos de enriquecimiento y/o identificación de células fetales descritos en el presente documento o junto con métodos de enriquecimiento y/o identificación de células fetales que se han descrito en la técnica anterior (por ejemplo documento US2007/0015171 descrito en la sección de antecedentes).

Fijación de las células de una muestra de sangre materna

Un primer aspecto de la descripción se basa en el descubrimiento de que la fijación de las células de una muestra de sangre materna aumenta enormemente la estabilidad de células fetales en una muestra de sangre materna, mientras que permite el enriquecimiento y la identificación de células fetales por ejemplo tal como se describe adicionalmente en el segundo aspecto de la invención. El procedimiento de fijación puede realizarse en una muestra de sangre no enriquecida inmediatamente tras la toma de muestras, dando como resultado la fijación de todos los componentes celulares en la muestra de sangre materna. Al mismo tiempo, la fijación es tan leve que los eritrocitos maternos pueden lisarse selectivamente en una etapa de lisis posterior.

Por tanto, un primer aspecto de la descripción es un método que comprende las etapas

- a. proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma
- b. poner en contacto la muestra con una disolución de fijación.

Preferiblemente, la muestra de sangre materna se pone en contacto con la disolución de fijación inmediatamente tras haberse obtenido la muestra. El término inmediatamente tal como se usa en el presente contexto significa que la muestra no se ha sometido a ninguna otra manipulación antes de ponerse en contacto con la disolución de fijación. Preferiblemente, la muestra se pone en contacto con la disolución de fijación no más de 24 horas tras haberse proporcionado la muestra. Más preferiblemente, la muestra se pone en contacto con la disolución de fijación no más de 12 horas, tal como 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 15 minutos tras haberse proporcionado la muestra. Lo más preferiblemente, la muestra se pone en contacto con la disolución de fijación no más de 1 hora tras haberse proporcionado la muestra.

En otra realización preferida, la disolución de fijación se añade a sangre completa y preferiblemente antes de una etapa de sedimentación opcional tal como por ejemplo sedimentación por gravedad o sedimentación por centrifugación.

La fijación se realiza preferiblemente durante entre 1 y 60 minutos. Más preferiblemente, la fijación se realiza durante entre 5 y 30 min y lo más preferiblemente, la fijación se realiza entre 5 y 15 minutos tal como 10 minutos.

La disolución de fijación comprende preferiblemente paraformaldehído entre el 2,5% y el 7,5%, más preferiblemente entre el 3% y el 6%, y lo más preferiblemente entre el 4% y el 5%.

5 Además de paraformaldehído, la disolución de fijación comprende preferiblemente sal a una concentración de entre 0,05 M y 0,3 M. Más preferiblemente, la concentración es de entre 0,1 y 0,2 M y lo más preferido es una concentración de entre 0,125 y 0,175 M. La sal es preferiblemente LiCl, KCl, NaCl o PBS, siendo PBS la más preferida.

10 Cuando se usan las concentraciones mencionadas anteriormente de la disolución de fijación, se prefiere añadir entre 0,2 y 10 volúmenes de la disolución de fijación a la muestra de sangre materna para su fijación, más preferiblemente se añaden entre 0,5 y 5 volúmenes y lo más preferiblemente se añaden entre 1 y 3 volúmenes. Normalmente se añaden 2 volúmenes. Aún en otra realización, se prefiere añadir entre 1/3 y 3/3 de volumen de disolución de fijación, por ejemplo 2/3 de volumen.

15 Quedará claro para el experto que las diversas concentraciones de la disolución de fijación y las veces de dilución pueden ajustarse tal como para dar las concentraciones finales deseadas una vez que se ha añadido la disolución de fijación a la muestra de sangre materna. Preferiblemente, la concentración final de paraformaldehído es de entre el 2 y el 6%, más preferiblemente entre el 3 y el 5% y lo más preferiblemente entre el 3,5% y el 4,5%. Una concentración final típica es del 4%.

Preferiblemente, la etapa de fijación va seguida por una etapa de lisis que comprende:

20 c. poner en contacto la muestra fijada de la etapa a con un tampón de lisis

- en la que el tampón de lisis comprende un detergente no iónico, preferiblemente Triton X-100. Las concentraciones preferidas del detergente son de entre el 0,01% y el 0,5%, más preferiblemente entre el 0,05% y el 0,3% y lo más preferiblemente del 0,1%.

En una realización preferida, la etapa de lisis se realiza inmediatamente tras la etapa de fijación.

25 Tal como se mencionó anteriormente, la etapa de lisis permite sorprendentemente la lisis selectiva de eritrocitos maternos.

Un segundo aspecto de la descripción es el uso de la disolución de fijación para fijar células fetales en una muestra de sangre materna o una fracción de la misma, tal como se describe en el primer aspecto. En una realización preferida, la disolución de fijación es para su uso en el método del cuarto aspecto.

30 Un tercer aspecto de la descripción es el uso del tampón de lisis para la lisis selectiva de eritrocitos maternos en una muestra de sangre materna o una fracción de la misma, tal como se describe en el primer aspecto. En una realización preferida, el tampón de lisis es para su uso en el método del cuarto aspecto.

Poner en contacto la muestra de sangre materna con un ligando o una sonda

Un cuarto aspecto de la presente descripción proporciona un método que comprende las etapas de

35 a. proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma

b. poner en contacto la muestra con

40 i. una sonda de hibridación dirigida a un ácido nucleico que comprende al menos 10 pb de un gen seleccionado del grupo que consiste en TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGD2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B o

50 ii. un ligando dirigido a un antígeno codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGD2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539,

ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B.

5 Los productos génicos de los genes se identifican en la tabla 1 así como también los niveles de expresión en células fetales y maternas. En los ejemplos se muestran los experimentos que verifican que los ARNm de estos genes se expresan preferentemente en células fetales a partir de una muestra de sangre materna.

10 El término “una fracción de la misma” se usa para indicar que la muestra de sangre materna puede ponerse en contacto directamente con un ligando o con una sonda de hibridación o que la muestra de sangre materna puede procesarse previamente tal como para que comprenda sólo una fracción de la muestra de sangre materna original cuando se pone en contacto con el ligando o la sonda de hibridación. La muestra de sangre materna puede someterse por ejemplo a la concentración de sus células, a una etapa de coagulación o a una etapa de enriquecimiento antes de ponerse en contacto con el ligando o la sonda de hibridación.

Sondas de hibridación

15 Las sondas de hibridación se usan igual que generalmente en la técnica y normalmente son ADN o ARN, preferiblemente ADN. En realizaciones preferidas, las sondas se modifican con nucleótidos no naturales que mejoran la afinidad de unión y/o la especificidad de unión. Los ejemplos preferidos de tales nucleótidos no naturales son LNA (ácidos nucleicos bloqueados), TINA (ácidos nucleicos intercalantes con torsión), PNA (ácido nucleico peptídico), INA (ácidos nucleicos intercalantes), monómeros de ARN morfolino- y 2'-O-sustituidos tales como monómeros de 2'-O-metil-ARN y 2'-O-(2-metoxietil)-ARN.

20 La longitud de las sondas es preferiblemente de entre 10 y 30 nucleótidos, más preferiblemente de 15-25 nucleótidos.

Colorantes indicadores

25 Las sondas de hibridación y los ligandos que van a usarse según la invención pueden comprender un colorante indicador (también denominado en el presente documento un marcador). Preferiblemente, el colorante indicador se selecciona del grupo que consiste en FAM[™], TET[™], JOE[™], VICT[™], SYBR® Green, 6 FAM, HEX, TET, TAMRA, JOE, ROX, fluoresceína, Cy3, Cy5, Cy5.5, rojo Texas, rodamina, verde rodamina, rojo rodamina, 6-carboxi-rodamina 6G, Alexa Fluor, verde Oregón 488, verde Oregón 500 y verde Oregón 514.

30 En una realización, las sondas de hibridación también comprenden un colorante de extinción. En una realización preferida, el colorante de extinción se selecciona del grupo que consiste en TAMRA[™], Black Hole Quencher[™], DABCYL, BHQ-1, BHQ-2, DDQ I, DDQ II y Eclipse Dark Quencher.

El uso del colorante indicador y de extinción es deseable porque permite diversos tipos de cuantificaciones además de identificación.

35 Normalmente, el colorante indicador y el colorante extintor se ubican cerca uno del otro en la sonda de hibridación, permitiendo que la fluorescencia inducida por luz o láser emitida por el indicador se extinga por el colorante extintor. Cuando el oligonucleótido se une a una hebra de molde complementaria, el colorante indicador y el colorante extintor se separan uno del otro de manera que el extintor ya no extingue la señal procedente del indicador, es decir puede detectarse la hibridación.

40 Por tanto, en una realización, la sonda de hibridación puede formar una estructura de tallo-bucle, en la que el colorante extintor y el indicador están próximos en el tallo. En una realización, el oligonucleótido es una denominada baliza molecular. El extintor y el indicador ya no están en proximidad, cuando la baliza molecular forma pares de bases con una hebra de molde. Por tanto, la señal inducida por láser procedente del colorante indicador ya no se extingue.

45 En lugar de usar un colorante indicador y un colorante extintor, puede usarse un denominado par de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que comprende un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor. Cuando el fluoróforo donador se excita por una fuente de luz externa, emite luz a una longitud de onda, que excita al fluoróforo aceptor, que a su vez emite luz a una longitud de onda diferente, que puede detectarse y medirse. La energía sólo se transfiere desde el donador hasta el aceptor si el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor están en proximidad cercana.

50 Los pares de FRET preferidos incluyen BFP-YFP, CFP-YFP, GFP-DsRed, GFP-Cy3, GFP-mOrange, YFP-RFP, FAM-ROX, FAM-Cy5, FAM-Hex, FAM-TAMRA y Cy3-Cy5.

Ligandos

El ligando tal como se usa en el método de la invención es preferiblemente un anticuerpo, un péptido o un aptámero.

Los aptámeros son ligandos de alta afinidad basados en ácidos nucleicos que se unen a antígenos tales como

5 proteínas. Normalmente se identifican usando técnicas de evolución *in vitro* tales como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial). En SELEX, se usan rondas repetidas de selección y amplificación de ácidos nucleicos de una biblioteca inicial para la identificación de aptámeros de alta afinidad. Puesto que la biblioteca inicial es muy grande (por ejemplo 10^{14} secuencias diferentes) y las secuencias pueden mutarse durante las rondas repetidas, la identificación de aptámeros de alta afinidad puede realizarse ahora de manera rutinaria y el experto conoce tales métodos. Los aptámeros preferidos tienen menos de 50 nucleótidos de longitud.

10 Pueden generarse péptidos de alta afinidad usando presentación en fagos. En la presentación en fagos, se selecciona una biblioteca de péptidos de presentación en fagos contra la diana y posteriormente se amplifican en un proceso de evolución similar a SELEX. Existen diversos sistemas para la presentación en fagos y puede elegirse el tamaño del péptido para que se adecúe a las necesidades particulares. En una realización, los péptidos que van a usarse con el método de la invención tienen un tamaño de menos de 50 aminoácidos.

15 A menudo la biblioteca se presenta en un soporte, por ejemplo un soporte de anticuerpo. Por tanto, puede usarse presentación en fagos para identificar anticuerpos de alta afinidad. Otras técnicas de evolución *in vitro* para la generación de anticuerpos implican la presentación en ARNm, la presentación en ribosomas y la presentación en ADN covalente.

También pueden generarse anticuerpos usando inmunización de animales adecuados tales como ratones, ratas, cabras, conejos, caballos, etc.

20 Los anticuerpos usados para la presente invención pueden ser o bien monoclonales o bien policlonales. El experto en la técnica conoce bien los métodos para generar ambos tipos de anticuerpos. Además de los métodos de evolución *in vitro* explicados resumidamente antes, los anticuerpos monoclonales se preparan normalmente usando tecnología de hibridomas.

Especificidad de ligandos

25 Preferiblemente, los ligandos se unen específicamente a células fetales. Cuando se hace referencia a la especificidad, lo que se quiere decir es que los ligandos tienen una afinidad de unión superior por células fetales que por células maternas. La afinidad de unión puede expresarse en términos de una constante de disociación (kd) y la especificidad como una razón entre la kd de un ligando dado para las células maternas y la kd del mismo ligando para las células fetales. Es decir, un ligando puede tener una kd de 10^{-5} M para las células maternas y de 10^{-9} M para las células fetales. En este caso, la especificidad sería de 10.000. Sin embargo, puesto que tanto las células fetales como las células maternas no son necesariamente una población homogénea, la especificidad también puede expresarse en términos de las veces de enriquecimiento que pueden lograrse con un ligando dado (tal como se describe adicionalmente más adelante).

30 En una realización preferida, los ligandos se generan mediante el método del quinto aspecto de la invención. Es decir, se ha optimizado la especificidad de los ligandos.

35 Preferiblemente, el método comprende además una etapa de identificación de células fetales de la muestra y/o una etapa de enriquecimiento de células fetales de la muestra. En una realización preferida, la etapa de enriquecimiento se realiza antes de la etapa de identificación.

Tras el enriquecimiento y/o la identificación, a menudo se realizan una etapa de detección y una etapa de predicción y/o diagnóstico.

Identificación

40 Cuando el método comprende una etapa de identificación, una realización comprende detectar la presencia del ligando o de la sonda de hibridación sobre o en las células fetales.

45 La detección puede permitirse marcando el ligando o la sonda de hibridación con colorantes fluorescentes u otros colorantes adecuados para la detección. Por tanto, el método puede ser por ejemplo hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La sonda puede comprender un extintor así como un fluoróforo o un par de FRET tal como se describió anteriormente, lo que permite la detección de las sondas de hibridación unidas a sus secuencias diana. Alternativa o adicionalmente, las sondas que se unen a sus dianas se separan de las sondas no unidas mediante una o más etapas de lavado.

La identificación también puede realizarse usando inmunotinción usando un ligando tal como un anticuerpo.

50 La identificación puede realizarse usando FISH multicolor o inmunotinción multicolor. Es decir, pueden usarse sondas de hibridación diferentes con marcadores fluorescentes diferentes simultáneamente o pueden usarse dos (o más) anticuerpos diferentes con marcadores fluorescentes diferentes simultáneamente. Pueden ser ambos específicos para las células fetales o uno puede ser específico para las células fetales y el otro puede ser específico para las células maternas.

Enriquecimiento

En una realización preferida, se realiza una etapa de enriquecimiento dependiente de ligando o dependiente de sonda de hibridación una vez que la muestra materna se ha puesto en contacto con el ligando o la sonda de hibridación. Para el enriquecimiento, se prefiere un ligando sobre una sonda de hibridación.

5 Cuando se hace referencia al enriquecimiento, lo que se quiere decir es que aumenta la razón de células fetales con respecto a células maternas de la muestra. Las veces de enriquecimiento es preferiblemente más de 1000 veces, incluso más preferiblemente más de 10.000 veces y lo más preferiblemente más de 100.000 veces.

10 En otra realización, las veces de enriquecimiento se seleccionan del grupo que consiste en más de 10 veces, más de 100 veces, más de 1000 veces, más de 10.000 veces, más de 100.000 veces y más de 1.000.000 de veces. La base del enriquecimiento son los ARNm identificados expresados preferentemente en células fetales y las proteínas codificadas por los ARNm.

15 Una parte de los ARNm específicos de células fetales identificados codifican para antígenos expuestos en la superficie y en una realización preferida, el ligando se dirige a un antígeno expuesto en la superficie celular codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en tomorregulina, EDN1, AHNAK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de ratón, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B.

El uso de ligandos dirigidos a antígenos expuestos en la superficie específicos de células fetales permite el enriquecimiento de células fetales a partir de una muestra materna sin permeabilizar las células (como es necesario para ácidos nucleicos o antígenos intracelulares capturados por sondas de hibridación).

20 Tal como quedará claro para el experto en la técnica, pueden realizarse etapas de enriquecimiento dependiente de antígenos adicionales basándose en ligandos (o antígenos) conocidas a partir de la técnica anterior. Ejemplos de tales antígenos conocidos a partir de la técnica anterior son: CD34, Tra, Oct1, Crypto1 y SSEA1.

Separación basada en el flujo

25 En una realización preferida, el enriquecimiento se realiza usando citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Por tanto, el ligando está marcado de manera fluorescente lo que permite FACS. El experto en la técnica conoce bien FACS y marcadores adecuados y se han facilitado ejemplos anteriormente.

Como alternativa a FACS, puede usarse separación celular en dispositivo microfluídico.

Inmovilización

30 En otra realización preferida, el enriquecimiento se realiza usando la inmovilización de los ligandos. Los ligandos pueden inmovilizarse por ejemplo sobre perlas tales como perlas magnéticas, perlas de Sepharose, perlas de agarosa, etc. Cuando se inmovilizan los ligandos y las células unidas a los mismos, pueden separarse por lavado las células no unidas de las perlas. Un procedimiento de lavado de este tipo puede realizarse de manera discontinua o en una columna. Tras el enriquecimiento (fraccionamiento), pueden eluirse las células unidas usando alta o baja concentración de sal, elementos de unión escindibles, alto o bajo pH, agentes de desnaturalización, etc. Más preferiblemente, las células unidas se eluyen usando elución competitiva con antígenos solubles o ligandos secundarios que se unen a ligandos específicos de células fetales, por ejemplo anticuerpos dirigidos a la parte fijada del ligando usado para la inmovilización.

40 Un método de enriquecimiento preferido es MACS (separación celular inmunomagnética), donde los ligandos se inmovilizan sobre perlas magnéticas. Es decir, las células unidas a los ligandos pueden separarse de las no unidas seleccionando las partículas usando magnetismo.

Selección negativa usando antígenos

45 También pueden usarse ligandos que se unen específicamente a células maternas para el enriquecimiento. Por tanto, en una realización preferida, el método comprende además una etapa de poner en contacto la muestra con un ligando específico de células maternas dirigido a un antígeno materno. Tras poner en contacto la muestra con un ligando específico de células maternas, puede realizarse el enriquecimiento por ejemplo usando FACS, MACS, dispositivos microfluídicos o inmovilización tal como se describió anteriormente.

Preferiblemente, el ligando se selecciona del grupo que consiste en ligandos que se unen a antígenos codificados por ARNm expresados preferentemente en células de sangre materna tal como se identifica por los presentes inventores.

50 Tal como quedará claro para el experto en la técnica, pueden usarse etapas de enriquecimiento dependiente de antígeno adicionales (selecciones negativas) basadas en ligandos (o antígenos) conocidas a partir de la técnica anterior. Por tanto en una realización, se realiza una etapa de enriquecimiento dependiente de antígeno adicional, en la que el ligando se selecciona del grupo que consiste en ligandos que se unen a antígenos específicos maternos conocidos a partir de la técnica anterior tales como CD45, HLA-A, HLA-B o anticuerpos seleccionados del grupo que

consiste en HLe-1, M3 y L4.

5 Un marcador de tipo celular preferido para la selección negativa es CD45, también conocido como antígeno común leucocitario. CD45 es una proteína transmembrana expresada por todas las células hematopoyéticas diferenciadas excepto por eritrocitos y células plasmáticas. La proteína CD45 existe en diferentes formas que se producen todas ellas a partir de un único gen complejo que da lugar a ocho ARNm maduros diferentes y que da como resultado ocho productos proteicos diferentes. Se expresa en todos los leucocitos pero no en otras células, y por tanto funciona como un marcador panleucocitario que incluye los diferentes y diversos tipos de leucocitos (o glóbulos blancos) tales como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos (células B y T), monocitos y macrófagos.

10 Debido a la expresión de CD45 en una gran mayoría de las células nucleadas presentes en la sangre materna, se prefiere una selección negativa usando el marcador CD45. Tras la reducción de células positivas para CD45, se recogen las células negativas para CD45 de la muestra. Tal reducción y recogida pueden realizarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica.

HLA

15 Los antígenos leucocitarios humanos, parte del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano, son responsables de las proteínas presentadoras de antígeno de la superficie celular y de muchos otros genes.

Están presentes dos clases de antígenos leucocitarios humanos, los antígenos de clase I (A, B y C) y los antígenos de clase II (DR, DP y DQ) que tienen funciones diferentes. Ambas clases incluyen un alto número de alelos variables. Los genes de HLA no expresados por células fetales pueden usarse para la reducción de células maternas en la muestra.

20 *Otros métodos de enriquecimiento*

También pueden usarse métodos de enriquecimiento adicionales que no usan ligandos específicos de antígeno.

25 Un método de enriquecimiento adicional preferido es la lisis de eritrocitos tal como la lisis mediada por NH_4Cl , que permite la lisis selectiva de eritrocitos dejando las células nucleadas intactas. Un experto en la técnica conoce este método. Para la lisis mediada por NH_4Cl se usa preferiblemente una concentración de NH_4Cl de 0,1-0,2 mM, tal como NH_4Cl 0,14-0,18 mM más preferiblemente NH_4Cl 0,15-0,17 mM.

Los métodos de fijación y lisis selectiva descritos en el primer aspecto también pueden usarse para enriquecimiento.

30 La muestra también puede someterse a separación inicial basándose en el tamaño o la densidad, tal como mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Esto da como resultado la producción de una capa de sobrenadante, que contiene plaquetas; una capa de células mononucleares; y un sedimento aglutinado que contiene granulocitos y eritrocitos no nucleados. La capa mononuclear se separa de las otras capas para producir una muestra materna enriquecida en células fetales.

También pueden utilizarse las propiedades físicas de las células, tales como pero no exclusivamente, la carga, para el enriquecimiento.

Combinación de ligandos y métodos de enriquecimiento

35 Tal como se entenderá, pueden combinarse los diversos ligandos y métodos de enriquecimiento. Por tanto, pueden usarse 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más ligandos específicos de células fetales al mismo tiempo o en sucesión. Así mismo, pueden usarse enriquecimientos repetidos usando respectivamente ligandos específicos de células fetales y ligandos específicos maternos.

La muestra

40 Es deseable obtener una muestra de sangre materna lo más grande posible con el fin de aumentar el número total de células fetales. Sin embargo, debido a problemas prácticos, la muestra debe estar dentro de determinados límites. Por consiguiente, el tamaño de la muestra de sangre materna está preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 50 ml, tal como en el intervalo de 1 a 40 ml, tal como desde 5 hasta 35 ml o de 10 a 30 ml.

45 La muestra de sangre materna proporcionada se obtiene preferiblemente de una mujer embarazada de entre 5-24 ó 6-20 semanas de gestación, más preferiblemente de entre 7-16 u 8-12 semanas de gestación.

Dilución - concentración

50 Además, según la invención la muestra puede diluirse o concentrarse en cualquier momento durante el método de enriquecimiento o identificación de una célula fetal (para facilitar la identificación de las células fetales y en relación con la viabilidad de las diferentes etapas del método). La muestra puede diluirse al menos 1,5 veces, tal como dos veces, más preferido al menos tres veces, tal como cinco veces añadiendo tampones isotónicos, tales como soluciones salinas, soluciones salinas tamponadas con fosfato, PBS y/o medios de crecimiento adecuados, tales

como medios basales y medios de crecimiento de tejidos. Una etapa del método puede incluir la dilución de una muestra mediante la adición de diversos componentes asignados para la etapa específica del método.

5 Para llevar a cabo el método, puede ser ventajoso para la viabilidad de las diferentes etapas del método concentrar la muestra por ejemplo para reducir el volumen sin eliminar ninguna célula. El volumen de muestra puede disminuirse hasta menos del 80%, tal como el 70, o el 60 o el 50% del volumen de muestra original, o incluso de manera preferible hasta menos del 40%, tal como el 25% del volumen de muestra original. Una etapa de concentración puede ser la centrifugación. El método según la invención puede comprender una o más etapas de concentración. La centrifugación es un método preferido para concentrar las células. Con el fin de evitar daños de las células se prefiere una centrifugación suave, tal como 300 g durante 10 minutos.

10 *Sedimentación*

Las células presentes en la muestra de sangre pueden concentrarse mediante sedimentación en lugar de centrifugación, en la que se permite que sedimenten la mayoría de las células presentes en la muestra. La muestra de sangre puede diluirse antes de la sedimentación en una disolución adecuada, tal como NaCl 0,15 M. La sedimentación puede continuar hasta que se produce la sedimentación total, tal como durante al menos 5 horas, o preferiblemente durante la noche.

15 Preferiblemente, se permite que la muestra sedimente a una temperatura por debajo de temperatura ambiente, tal como a una temperatura de menos de 15°C, tal como menos de 10°C u 8°C o 6°C, preferiblemente a una temperatura de 2-8°C o de aproximadamente 4°C.

20 Puede que no sedimente una población minoritaria de células con una densidad baja y puede aislarse mediante fijación previa suave tal como se describe más adelante, tal como en paraformaldehído al 0,5% seguido por centrifugación.

Fijación

25 En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, las células de la muestra de sangre materna se fijan tal como se describe en el primer aspecto de la invención. Por tanto, en una realización preferida, los eritrocitos maternos se lisan de manera selectiva inmediatamente tras la fijación.

Detección y diagnóstico

Preferiblemente, el método de la invención se usa para la detección y predicción y/o diagnóstico prenatales. Por tanto, una célula identificada puede someterse a detección y predicción y/o diagnóstico o una muestra de sangre materna enriquecida en células fetales puede someterse a detección y predicción y/o diagnóstico.

30 En una realización, las proteínas fetales se ponen a disposición para detección por ejemplo a través de inmunotransferencia, secuenciación de proteínas o espectrometría de masas.

En otra realización preferida, la detección y/o el diagnóstico comprenden una etapa de poner a disposición el ADN o el ARN fetal para detección.

35 Los métodos de detección preferidos son FISH (hibridación *in situ* fluorescente), transferencia de tipo Northern, transferencia de tipo Southern, secuenciación de ADN/ARN, análisis de micromatriz y amplificación. Tales métodos pueden usarse para detectar la presencia de secuencias específicas que indican un determinado estado, por ejemplo enfermedad prenatal o predisposición a una determinada enfermedad. Los métodos también pueden usarse para detectar una aneuploidía cromosómica tal como trisomía 13, trisomía 18 o trisomía 21. Los métodos de detección también pueden usarse para determinar el sexo del feto mediante la detección de secuencias específicas de Y.

40 En una realización alternativa, se compara el número de células fetales en la muestra con un número patrón. El aumento de números de células fetales en la muestra puede indicar que el embarazo corre riesgo. Puede estimarse el número de células fetales en la muestra (así como en una muestra control) usando por ejemplo FACS.

Identificación de ligandos específicos

45 Un quinto aspecto de la descripción es un método de identificación de un ligando específico de células fetales que comprende las etapas:

a) proporcionar una biblioteca de candidatos de ligando específico de células fetales

b) proporcionar un conjunto de células maternas

c) poner en contacto la biblioteca de la etapa a con las células maternas de la etapa b

50 d) seleccionar los ligandos que no se unen a las células maternas para generar una biblioteca reducida para

ligandos que se unen a células maternas.

En una realización preferida, el método comprende además las etapas de

e) poner en contacto la biblioteca de la etapa a o la biblioteca de la etapa d con una célula fetal

5 f) seleccionar los ligandos que se unen a la célula fetal para generar una biblioteca que está enriquecida en ligandos que se unen a células fetales, pero no a células maternas.

Debe quedar claro que basta una célula para la selección de los ligandos de la etapa f, pero que obviamente pueden usarse más células fetales.

Las etapas b-f pueden llevarse a cabo mediante las etapas de

g) proporcionar una muestra de sangre materna

10 h) poner en contacto la biblioteca con una muestra de sangre materna

i) seleccionar los ligandos que se unen a las células fetales extrayendo células fetales individuales, que se han identificado mediante demostración por FISH de un cromosoma Y, y recoger los ligandos únicamente de esas células.

La muestra de sangre materna puede haberse enriquecido en células fetales.

15 En una realización preferida, el método comprende además:

j) multiplicar/amplificar los ligandos seleccionados tal como para preparar una biblioteca amplificada para selecciones adicionales contra células fetales y/ o contra células maternas.

Tal como quedará claro, pueden realizarse múltiples rondas de selección y amplificación para identificar los mejores ligandos.

20 La biblioteca de candidatos de ligando específico de células fetales puede ser una biblioteca de anticuerpos o péptidos presentados en fagos (presentación en fagos), ARNm (presentación en ribosomas o presentación en ARNm) o en ADN (presentación covalente o selección de plásmidos). La biblioteca también puede ser una biblioteca de oligonucleótidos de ADN o ARN para la identificación de aptámeros.

25 El término "candidatos" se usa para dar a entender que los compuestos de la biblioteca no se unen necesariamente a las células fetales. Tienen que someterse a pruebas de unión para la identificación de ligandos específicos de células fetales.

En una realización, la biblioteca de candidatos de ligando específico de células fetales es una biblioteca completamente al azar. En tal caso, la biblioteca puede seleccionarse repetidamente en primer lugar contra células fetales y amplificarse, antes de que se realice la contraselección (selección negativa) contra células maternas.

30 En otra realización, la biblioteca de candidatos de ligando específico de células fetales se basa en ligandos de células fetales conocidos. Una biblioteca de este tipo puede crearse por ejemplo presentando un anticuerpo que se une a células fetales en un fago y mediante la mutagénesis del gen que codifica para el anticuerpo para crear una biblioteca. En tal caso, la mutagénesis puede mejorar la especificidad mientras se conserva o incluso se mejora la afinidad por células fetales.

35 En una realización, el ligando se une a un antígeno codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en tomorregulina, EDN1, AHNAK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de ratón, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B. Por tanto, la afinidad y/o la especificidad del ligando se optimizan usando el método explicado
40 resumidamente antes.

Sondas de hibridación y ligandos específicos de células fetales

Un sexto aspecto de la descripción es

45 i. un ligando que se une a un antígeno codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1,
50 CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171,

NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B

ii. o una sonda de hibridación dirigida a un ácido nucleico que comprende al menos 10 pb de un gen seleccionado del grupo que consiste en TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGPD2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B.

Más preferiblemente, el ligando es un ligando que se une a un antígeno codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en tomorregulina, EDN1, AHNAK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de ratón, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2, MMP23A/MMP23B es decir antígenos expuestos en la superficie. Preferiblemente, la kd del ligando para el antígeno elegido es de menos de 10^{-8} M, 10^{-9} y 10^{-10} M. La kd del ligando para cualquier antígeno presente en células de sangre materna es preferiblemente al menos 100 veces superior y incluso más preferiblemente más de 1000 o 10.000 veces superior.

En una realización, el ligando es característico porque permite la selección correcta en el 90% de células en una muestra de prueba que comprende el 99,9% de células maternas y el 0,1% de células fetales. Es decir, cuando se hace referencia a la identificación correcta en el 90%, lo que se quiere decir en el presente documento es que cuando se realiza la selección con la muestra de prueba y con el ligando, se recogerán 90 células fetales por cada 10 células maternas y del mismo modo para una exactitud mejor/peor. Un método de selección preferido es MACS. Más preferido es un ligando que permite la selección correcta en el 95%, la selección correcta en el 98% o incluso más preferido, la selección correcta en el 99%. Puesto que una muestra de sangre materna tiene una abundancia de células fetales muy baja, es incluso más preferido que el ligando permita la selección celular correcta en el 99,9%, el 99,99% o el 99,999% a partir de una muestra de prueba tal como se describió anteriormente.

Preferiblemente, los ligandos del sexto aspecto son aptámeros, péptidos o anticuerpos tal como se describe en los aspectos cuarto y quinto. Los más preferidos son los anticuerpos.

Los ligandos se identifican preferiblemente usando el método del quinto aspecto tal como para tener una especificidad mejorada.

Un séptimo aspecto de la descripción es el uso de los ligandos o sondas de hibridación del sexto aspecto para enriquecer una muestra de sangre materna en células fetales o para identificar células fetales en una muestra de sangre materna. Preferiblemente, el uso de los ligandos o las sondas de hibridación es tal como se describe en el cuarto aspecto de la invención.

Un octavo aspecto de la descripción es un kit que comprende un ligando o una sonda de hibridación tal como se describe en el sexto aspecto de la descripción e instrucciones para su uso.

El kit comprende un primer ligando para enriquecimiento y un segundo ligando y/o una sonda de hibridación para su identificación.

En una realización preferida, el kit también comprende un tampón de fijación y un tampón de lisis tal como se describe en el primer aspecto de la descripción.

Los siguientes ejemplos 1 y 3 son ejemplos de la invención y los ejemplos 2, 4-5 son ejemplos de referencia, que no forman parte de la invención

Ejemplos

El ejemplo 1 está escrito en tiempo presente porque explica resumidamente las etapas metódicas que han de realizarse cuando se enriquecen y/o identifican células fetales a partir de una muestra de sangre materna usando los métodos de la invención. Normalmente no son necesarias síntesis de ADNc ni micromatrices para el enriquecimiento y/o la identificación, pero pueden usarse en algunas situaciones. Debe quedar claro que las etapas descritas en el ejemplo 1 se han llevado a cabo realmente para la identificación de ARNm expresados preferentemente en células fetales a partir de una muestra de sangre materna.

Ejemplo 1

Identificación de ARNm expresados preferentemente en células fetales de una muestra de sangre materna.

Fijación, lisis y permeabilización de sangre materna.

ES 2 533 861 T3

Se obtienen muestras de sangre periférica de 10 a 30 ml de mujeres embarazadas en edad gestacional de 11 a 14 semanas. Se extraen muestras de sangre antes de un procedimiento invasivo y tras el consentimiento informado. Todas las muestras se recogen en tubos heparinizados y se procesan inmediatamente tras haberse recogido.

5 Además de la sangre con heparina, se extraen 5 ml de sangre en tubos con EDTA. Esta sangre se usa para el análisis del sexo fetal. El sexo del feto se establece analizando el ADN fetal libre.

10 Por cada muestra, se añade una alícuota de 3 ml de sangre completa en tubos de centrifugación de 50 ml con recubrimiento previo (de 3 a 10 tubos de 50 ml por muestra) usando pipetas con recubrimiento previo (el tampón de recubrimiento previo es BSA al 2% en PBS sin Ca²⁺, Mg²⁺). Se añaden dos ml de formaldehído al 10% en PBS a cada tubo usando pipetas con recubrimiento previo. Tras mezclar cuidadosamente, se fijan las células sanguíneas durante 10 minutos a temperatura ambiente.

15 Tras la fijación, se añaden 30 ml de Triton X-100 al 0,12% en PBS (sin Ca²⁺, Mg²⁺) a cada tubo. Se invierten los tubos 3 veces y se lisan los glóbulos rojos durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras la lisis, se añaden 15 ml de BSA al 2% frío (4°C) en PBS (sin Ca²⁺, Mg²⁺) a cada tubo. Tras mezclar mediante inversión los tubos 2 veces, se sedimentan las células no lisadas mediante centrifugación a 500 g durante 15 minutos a 40 C. Tras retirar el sobrenadante, se resuspenden las células en 10 ml de PBS frío a 40 C sin Ca²⁺, Mg²⁺, y se almacenan las muestras a 4°C durante la noche.

20 Sólo se analizan adicionalmente las muestras de sangre de mujeres embarazadas con un feto varón. Estas muestras se permeabilizan añadiendo 10 ml de metanol frío (-20°C) a la suspensión celular de 10 ml almacenada durante la noche, y se permeabilizan las células durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación a 500 g durante 10 minutos, se reúnen los sedimentos de células en un tubo usando pipetas con recubrimiento previo. Se aclaran los tubos vacíos con 1 ml de PBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 mM. Entonces se transfieren las células reunidas a un tubo de 15 ml y se centrifugan a 500 g durante 10 minutos y se resuspenden en lo que corresponde a 40 µl de PBS que contiene BSA al 0,5% y EDTA 2 mM por 1 ml de sangre completa, y se realizan frotis de las células sobre portaobjetos recubiertos con polilisina (4 µl cada uno). Se obtienen un total de 60 portaobjetos de cada muestra de sangre de varón. Tras secar al aire los portaobjetos, se sellan individualmente en bolsas de plástico herméticas y se almacenan a -20°C hasta el análisis adicional.

30 Identificación de células fetales de varón mediante FISH de colores invertidos y barrido automático. Se recuperan los portaobjetos del congelador y se retiran las bolsas de plástico herméticas. Antes de la hibridación, se aclaran los portaobjetos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y durante 5 minutos antes de deshidratarse 3 minutos cada uno en etanol al 60%, el 80% y el 99,9% etanol y se seca al aire.

35 Se usan sondas de repetición específicas de cromosoma, DXZ1 marcada con Spectrum Green y DYZ1 marcada con Spectrum Orange (Abbott Molecular) para la primera hibridación. Se prepara una mezcla de hibridación que contiene ambas sondas mezclando 1 parte de la sonda de X, una parte de la sonda de Y, 1 parte de agua destilada y 7 partes del tampón de hibridación (Vysis). Para la FISH de portaobjetos total, se añaden 28 µl de la mezcla de hibridación y se cubre mediante un cubreobjetos de 22 x 50 mm. Se sellan los cubreobjetos con cemento de caucho y se desnaturalizan los ADN sobre una placa caliente a 83,5°C durante 7 minutos y se hibridan durante la noche en una atmósfera humidificada a 42°C.

40 Al día siguiente se lavan los portaobjetos hibridados durante 2 minutos en 0,4 x SSC/Tween 20 al 0,3% a 73°C y durante 1 minuto en 2 x SSC/Tween 20 al 0,1% a temperatura ambiente. Entonces se montan los portaobjetos en medio de montaje Vectashield con DAPI 1,5 µg/ml como contratinción.

45 Se identifican las células que contienen una señal roja ubicada en un núcleo teñido con DAPI mediante barrido automático usando dos tipos diferentes de dispositivos de barrido. El sistema de barrido de portaobjetos MDS (versión 5.8.0) desarrollado originalmente por Applied Imaging, y el sistema de barrido MetaCyte desarrollado por MetaSystems. Con el sistema de barrido MDS, se someten a barrido los portaobjetos a ampliación de 20x usando la función de barrido 5. Con MetaCyte, se someten a barrido los portaobjetos a ampliación de 10x usando un clasificador optimizado de manera interna para detectar verdaderas señales de FISH con Spectrum Orange. Tras el barrido, se inspeccionan visualmente las células identificadas por el dispositivo de barrido mediante reubicación automática. Se descartan las células que tienen una señal roja pero dos señales verdes en X, mientras que las células que tienen una señal roja y una señal verde en X o una señal en X verde dividida se clasifican como células fetales de varón candidatas.

55 Se analiza el verdadero origen fetal de las células fetales candidatas mediante rehibridación de las células candidatas con las mismas sondas de X e Y en colores invertidos. En primer lugar, se retiran los cubreobjetos incubando los portaobjetos en 4 x SSC/Tween 20 al 0,1% durante 10 minutos. Entonces se lavan los portaobjetos en 2 x SSC durante 5 minutos, se deshidratan a través de etanol al 60%, al 80% y al 99,9% y se secan al aire. Se usa la mezcla de hibridación que contiene 1 parte de las sondas de repetición específicas de cromosoma, DXZ1 marcada con Spectrum Red, 1 parte de la sonda de repetición específica de cromosoma DYZ1 marcada con Spectrum Green, 1 parte de agua destilada y 7 partes de tampón de hibridación para la rehibridación. Para la FISH de portaobjetos total, se añaden 28 µl de la mezcla de hibridación y se cubre mediante un cubreobjetos de 22 x 50

mm. Para la FISH selectiva, se aplican 2,5 µl de mezcla de hibridación en posiciones sobre los portaobjetos en los que se habían encontrado células fetales candidatas y se extienden las mezclas cubriendo con un cubreobjetos circular de 10 mm. Entonces se sellan los cubreobjetos con cemento de caucho y se desnaturalizan los ADN sobre una placa caliente a 83,5°C durante 7 minutos y se hibridan durante la noche en una atmósfera humidificada a 42°C.

- 5 Tras la rehibridación se lavan los portaobjetos durante 2 minutos en 0,4 x SSC/Tween 20 al 0,3% a 73°C y durante 1 minuto en 2 x SSC/Tween 20 al 0,1% a temperatura ambiente. Entonces se montan los portaobjetos en medio de montaje Vectashield que contiene DAPI.

10 Se colocan los portaobjetos rehibridados en el microscopio de barrido y se reubican las células fetales candidatas rehibridadas y se analizan visualmente las señales de FISH. Las células fetales candidatas rehibridadas en las que la señal roja sigue siendo roja y la señal verde ha cambiado a roja se clasifican como células fetales falsas (< 5%), mientras que las células fetales candidatas rehibridadas en las que la señal roja ha cambiado a verde y la señal verde a roja se clasifican como células fetales verdaderas (> 95%).

PALM

- 15 Cuando se han detectado 23 células fetales mediante rehibridación, se determinan las posiciones exactas (coordenadas) de las células fetales individuales sobre los portaobjetos de microscopio usando una retícula Englandfinder, de manera que puedan volver a encontrarse las células fetales en otros microscopios.

20 Se obliga a las células fetales a salir de los portaobjetos de microscopio mediante el uso de la tecnología de microdissección láser y catapultado por presión (*Laser Microdissection and Pressure Catapulting*, (LMPC)) en un sistema de microscopio PALM MicroBeam de Carl Zeiss. Los portaobjetos de microscopio que contienen células fetales se transportan a Carl Zeiss Microlmaging GmbH, (ubicado en Munich, Alemania), donde vuelven a encontrarse las células fetales usando sus coordenadas específicas en la retícula Englandfinder. Se retiran cuidadosamente los cubreobjetos tras sumergir los portaobjetos en PBS durante 10-15 minutos. Entonces se aclaran los portaobjetos durante 10 minutos en PBS antes de deshidratarse 3 minutos cada uno en etanol al 60%, al 80% y al 99,9% y secarse al aire. Entonces se obliga a las células fetales a salir del portaobjetos al interior de una tapa adhesiva de un tubo de tamaño para PCR mediante catapultado por láser usando un microscopio PALM MicroBeam. Se recogen las 23 células fetales en la misma tapa. En otra tapa se recogen células control maternas: De cada portaobjetos que contiene una célula fetal, se recogen 100 células maternas circundantes en el interior de la tapa de control, dando un número total de 2300 células control maternas. Los dos tubos que contienen las células fetales y las células control en sus tapas, respectivamente, se envían a Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania, para el análisis adicional.

30 Se amplifica el ARN de la muestra fetal y la muestra control por Miltenyi Biotec mediante su SuperAmp Service tal como se describe en su página web. Se usa el ADNc amplificado para preparar dos tipos diferentes de micromatrices: la micromatriz de genoma completo de Agilent y la micromatriz de células madre PIQOR™, tal como se describe en la página web de Miltenyi Biotec.

- 35 A partir de los resultados de las micromatrices, se seleccionan en primer lugar 61 genes (enumerados en la tabla 1) como candidatos probables para marcadores de células fetales. Se seleccionan basándose en tres criterios diferentes: se seleccionan 41 genes porque tienen 2 o más sondas diferentes en la matriz que muestran fuertes señales en la matriz de genoma completo de Agilent fetal y ninguna señal o señales muy débiles en la matriz de genoma completo de Agilent materna. Se seleccionan 10 genes debido a las señales muy fuertes en la matriz de genoma completo de Agilent fetal.

45 Los últimos 10 genes se seleccionan porque están en ambas matrices de genoma completo de Agilent y la micromatriz de células madre PIQOR™ muestra señales en la matriz (Agilent)/canal fetal (micromatriz de células madre PIQOR™), pero no en la matriz/canal materna/o. Los 61 genes se estudian a fondo en la bibliografía y basándose en esto, se seleccionan 9 genes como candidatos de marcador de células fetales expuesto en la superficie celular: EDN1, AHNAK, tomorregulina, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de ratón, ACVR2B.

Tabla 1:

Nombre del gen	Nombre sistemático	Descripción	Señal materna	Señal fetal
ZNF614	NM_025040	Gen de proteína con dedos de zinc 614 (ZNF614) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_025040]	2,50	52,61
ZNF539	NM_203282	Gen de proteína con dedos de zinc 539 (ZNF539) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_203282]	1,66	20,81
ZNF283	AK098175	Gen de FLJ40856 fis de ADNc de <i>Homo sapiens</i> , clon TRACH2016498, moderadamente similar a proteína con dedos	1,21	773,52

ES 2 533 861 T3

		de zinc 184. [AK098175]		
ZFYVE9	NM_004799	Gen que contiene el dominio FYVE con dedos de zinc 9 (ZFYVE9) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 3, ARNm [NM_004799]	1,86	785,02
WRN	NM_000553	Gen de síndrome de Werner (WRN) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000553]	0,86	13,39
UBL4A	NM_014235	Gen de 4A similar a ubiquitina (UBL4A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_014235]	0,87	80,27
TPM3	NM_153649	Gen de tropomiosina 3 (TPM3) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm [NM_153649]	1,03	25,86
TP73	NM_005427	Gen de proteína tumoral p73 (TP73) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005427]	0,89	14,53
TMEFF2	AB004064	ARNm para tomorregulina de <i>Homo sapiens</i> , secuencia codificante completa [AB004064]	2,73	899,23
THC2274391	THC2274391	Gen de RIFK_HUMAN (Q969G6) Riboflavina cinasa (ATP:riboflavina 5'-fosfotransferasa) (flavocinasa), completa [THC2274391]	0,87	893,63
THC2265980	THC2265980	Gen de T97996 ye56c04.s1 Soares, hígado-bazo fetal 1NFLS, clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> , IMAGE:121734 3' similar a SP:RL2B_RAT P29316 PROTEÍNA RIBOSÓMICA 60S, secuencia de ARNm [T97996]	0,92	62,58
T (BRACHYURY)	NM_003181	Gen de T de <i>Homo sapiens</i> , homólogo de brachyury (ratón) (T), ARNm [NM_003181]	5,38	44,45
SYT9	NM_175733	Gen de sinaptotagmina IX (SYT9) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_175733]	0,89	1567,50
SLAMF1	NM_003037	Gen de miembro 1 de la familia de moléculas de activación linfocitaria de señalización (SLAMF1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_003037]	1,05	62,58
RPS27	NM_001030	Gen de proteína ribosómica S27 (metalopanestimulina 1) (RPS27) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001030]	0,90	639,19
RPL39	NM_001000	Gen de proteína ribosómica L39 (RPL39) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001000]	0,87	869,05
RPL26	NM_000987	Gen de proteína ribosómica L26 (RPL26) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000987]	0,92	313,51
RPL23A	NM_000984	Gen de proteína ribosómica L23a (RPL23A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000984]	0,91	25,80
RPL23	NM_000978	Gen de proteína ribosómica L23 (RPL23) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000978]	2,28	943,60
RP11-78J21.1	NM_001011724	Gen de ribonucleoproteína heterogénea nuclear similar a A1 (LOC144983) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm [NM_001011724]	0,89	52,05
RGPD2	NM_001024457	Gen que contiene el dominio similar a RANBP2 y GRIP 2 (RGPD2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001024457]	2,19	715,07
QPRT	NM_014298	Gen de quinolinato fosforribosiltransferasa (nicotinato-nucleótido pirofosforilasa (carboxilante)) (QPRT) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_014298]	1,95	214,40
PPIA	NM_203430	Gen de peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina A) (PPIA) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm [NM_203430]	0,88	230,29
PGK1	NM_000291	Gen de fosfoglicerato cinasa 1 (PGK1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_000291]	0,93	22,71
PF4	NM_002619	Gen de factor plaquetario 4 (ligando quimiocina (motivo C-X-C) 4) (PF4) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002619]	0,97	8,48
NTRK1	NM_002529	Gen de tirosina cinasa neurotrófica, receptor, tipo 1 (NTRK1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm [NM_002529]	2,77	10,84

NBR2	NM_005821	Gen 2 adyacente a BRCA1 (NBR2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005821]	0,99	247,30
MYL6	NM_079423	Gen de miosina de <i>Homo sapiens</i> , polipéptido ligero 6, álcali, músculo liso y distinto de músculo (MYL6), variante de transcrito 2, ARNm [NM_079423]	2,19	4314,15
MAPK3	NM_002746	Gen de proteína cinasa 3 activada por mitógeno (MAPK3) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm [NM_002746]	1,22	10,99
MAD2L1	NM_002358	Gen deficiente en parada mitótica de MAD2 de tipo 1 (levaduras) (MAD2L1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002358]	0,96	9,16
LOC389286	NM_001018022	Gen similar a FKSG62 (LOC389286) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001018022]	0,89	378,70
KY	NM_178554	Gen de cifoescoliosis peptidasa (KY) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_178554]	0,95	868,36
KMO	NM_003679	Gen de cinurenina 3-monooxigenasa (cinurenina 3-hidroxilasa) (KMO) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_003679]	0,88	163,00
KCNK4	NM_033310	Gen del canal de potasio, subfamilia K, miembro 4 (KCNK4) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_033310]	12,21	204,06
ITGA7	NM_002206	Gen de integrina, alfa 7 (ITGA7) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002206]	0,92	10,02
HMG2	NM_005517	Gen de dominio de unión nucleosómico de grupo de alta movilidad 2 (HMG2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_005517]	2,16	22,05
HMG1	NM_002131	Gen de AT-hook 1 de grupo de alta movilidad (HMG1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm [NM_002131]	1,81	74,66
HLA-C	BC002463	Gen de complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, C de <i>Homo sapiens</i> , ARNm (clon de ADNc MGC:2285 IMAGE:3345005), secuencia codificante completa [BC002463]	0,98	40,27
HIST1H2AJ	NM_021066	Gen de histona 1, H2aj (HIST1H2AJ) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_021066]	2,97	49,45
GSK3A	NM_019884	Gen de glucógeno sintasa cinasa 3 alfa (GSK3A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_019884]	2,81	1780,97
GCC2	NM_181453	Gen que contiene el dominio GRIP y superenrollado 2 (GCC2) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm [NM_181453]	2,80	831,61
FYN	NM_002037	Oncogén FYN relacionado con SRC, FGR, YES (FYN) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm [NM_002037]	0,90	28,36
FLJ35740	NM_147195	Gen de proteína FLJ35740 (FLJ35740) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_147195]	0,99	15,22
ENST00000356196	ENST00000356196	PREVISTO: Gen de proteína ribosómica L26 similar a 60S (proteína de gen 20 inducida por sílice) (SIG-20) de <i>Homo sapiens</i> (LOC400055), ARNm [XM_374987]	2,23	940,84
EEF1A1	NM_001402	Gen de factor 1 alfa 1 de elongación de traducción eucariota (EEF1A1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001402]	1,29	160,32
EDN1	NM_001955	Gen de endotelina 1 (EDN1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001955]	0,89	404,58
DKFZp434F142	AL136837	ARNm; DKFZp434F142 de ADNc (del clon DKFZp434F142) de <i>Homo sapiens</i> . [AL136837]	2,53	310,56
D4ST1	NM_130468	Gen de dermatán 4 sulfotransferasa 1 (D4ST1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_130468]	1,79	25,13
CRYL1	NM_015974	Gen de lambda 1 cristalina (CRYL1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_015974]	1,93	15,35
CPS1	NM_001875	Gen de carbamoil-fosfato sintetasa 1, mitocondrial (CPS1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001875]	0,91	35,55

CD7	NM_006137	Gen de molécula de CD7 (CD7) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_006137]	20,39	145,67
CCNA2	NM_001237	Gen de ciclina A2 (CCNA2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001237]	0,88	52,42
CB123670	CB123670	Clon de ADNc de <i>Homo sapiens</i> K-EST0172083 L12JSHC0, L12JSHC0-2-D12 5', secuencia de ARNm [CB123670]	1,53	812,97
BC111482	BC111482	Clon de ADNc IMAGE:5743861 de <i>Homo sapiens</i> , con intrón retenido aparente. [BC111482]	0,88	51,28
BC089454	BC089454	Clon de ADNc MGC:105145 IMAGE:30563285 de <i>Homo sapiens</i> , secuencia codificante completa [BC089454]	0,84	51,55
ALS2CL	NM_147129	Gen similar a extremo C terminal de ALS2 (ALS2CL) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm [NM_147129]	2,96	14,83
AK000420	AK000420	Gen de FLJ20413 fis de ADNc de <i>Homo sapiens</i> , clon KAT02170. [AK000420]	0,91	113,52
AHNAK	NM_001620	Gen de nucleoproteína AHNAK (desmoyoquina) (AHNAK) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm [NM_001620]	2,53	1672,13
ADAM11	NM_002390	Gen de dominio 11 de ADAM metalopeptidasa (ADAM11) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_002390]	0,99	21,49
ACVR2B	NM_001106	Gen de receptor de activina A, tipo IIB (ACVR2B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm [NM_001106]	5,13	39,23
ABHD2	NM_007011	Gen que contiene el dominio abhidrolasa 2 (ABHD2) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm [NM_007011]	0,96	21,99

Ejemplo de referencia 2

Identificación de células fetales a partir de una muestra de sangre materna usando ligandos.

Depleción de células maternas positivas para CD45 y GPA.

5 Se procesan muestras de sangre materna usadas para la identificación de células fetales usando ligandos específicos de células fetales tal como se describe en el ejemplo 1. Tras la centrifugación final a 500 g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 80 μ l por 107 células de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM usando una micropunta con recubrimiento previo. Se añaden 20 μ l de microperlas con CD45 y 40 μ l de microperlas con GPA. Tras mezclar usando una micropunta con recubrimiento previo, se incuban las células durante 15 minutos a 40C. Se lavan las células añadiendo 5 ml de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 10 2 mM y se centrifugan a 500 g durante 10 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 2 ml de PBS con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM usando una punta de pipeta con recubrimiento previo. Se carga la suspensión celular en una columna LD lavada previamente y se recoge el flujo no retenido en un tubo nuevo con recubrimiento previo. Cuando ha pasado la suspensión celular, se lava la columna 3 veces con 1 ml de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM. Entonces se centrifuga el tubo que contiene el flujo no retenido a 500 g durante 15 15 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 400 - 600 μ l (si hay 24 ml de sangre) de PBS con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM usando puntas de pipeta con recubrimiento previo y se colocan las células sobre portaobjetos recubiertos con polilisina y se secan al aire los portaobjetos durante la noche. Una muestra de sangre de 24 ml normalmente da de 10 a 15 portaobjetos con un área de frotis celular de 15 x 15 mm por portaobjetos.

20 Identificación de células fetales.

Las células fetales se identifican usando un anticuerpo contra el producto de uno de los genes expresados preferentemente en células fetales tales como por ejemplo sinaptotagmina IX que es el producto de SYT9.

25 Tras secar al aire, se rehidratan los portaobjetos en 4 x SSC durante 5 minutos, entonces se incuban previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 μ l de tampón de bloqueo que consiste en 4 x SSC que contiene BSA al 1% y reactivo de bloqueo al 0,5% (Roche). Entonces se incuban los portaobjetos durante 30 minutos a TA con 100 μ l de disolución de anticuerpo primario biotinilado diluida en tampón de bloqueo según las instrucciones de los fabricantes. Tras la incubación con anticuerpo, se lavan los portaobjetos tres veces durante 5 minutos en 4 x SSC. Para detectar anticuerpo unido a las células fetales, se incuban los portaobjetos con 100 μ l de estreptavidina conjugada con FITC diluido 1:100 en tampón de bloqueo durante 30 minutos a TA. Tras lavar dos veces durante 5

minutos cada una en 4 x SSC y una vez durante 5 minutos en 2 x SSC, se montaron los portaobjetos en medio de montaje Vectashield que contiene 1,5 µg de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para contrateñir los núcleos.

- 5 Se identifican las células fetales teñidas con anticuerpos mediante barrido automático usando el programa Metafer desarrollado por Metasystems. Se someten a barrido los portaobjetos a ampliación de 10x usando un clasificador desarrollado de manera interna optimizado para detectar células teñidas con sinaptotagmina. El verdadero origen fetal de las células teñidas con anticuerpos puede confirmarse mediante FISH de XY tal como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

Enriquecimiento de células fetales a partir de una muestra de sangre materna

- 10 Marcaje con anticuerpos.

Se procesan las muestras de sangre materna usadas para el enriquecimiento de células fetales usando un ligando específico de células fetales tal como se describe en el ejemplo 1. Tras la centrifugación final a 500 g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 95 µl de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM por 10^7 células. Se añaden 5 µl por 10^7 células de anticuerpo anti-TMEFF biotinilado usando puntas de pipeta con recubrimiento previo. Tras mezclar, se incuban las células durante de 30 a 60 minutos a o bien 40C o bien temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavan las células añadiendo 5 ml de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM. Tras la centrifugación durante 10 minutos a 500 g, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 80 µl de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM por 10^7 células. Se añaden 20 µl de microperlas con anti-biotina por 10^7 células usando una punta de pipeta con recubrimiento previo. Tras mezclar, se incuban las células durante de 30 minutos a 40C. Se lavan de nuevo las células añadiendo 5 ml de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM. Tras la centrifugación durante 10 minutos a 500 g, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 5 ml de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM.

Selección positiva usando MACS

- 25 Se colocan una columna LD lavada previamente y una columna MS lavada previamente sobre los imanes, se apilan. Se aplica la suspensión de células marcadas a la parte superior de la columna LD. Cuando las células han pasado por la columna LD, se lava dos veces con 2 ml y PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM. Se retira la columna LD del imán y se coloca sobre un tubo de centrifugación de 15 ml con recubrimiento previo nuevo. Se eluyen las células aplicando 2 veces 5 ml de PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM. Los primeros 5 ml de tampón pasan por la columna sin aplicar el émbolo. Los segundos 5 ml de tampón pasan por la columna aplicando el émbolo. Entonces se retira la columna MS del imán y se coloca sobre el tubo de recogida. Se eluyen las células de la misma forma que para la columna LD usando 2 veces 1 ml de tampón frío en lugar de 2 x 5 ml. Se centrifuga el tubo de recogida durante 10 minutos a 500 g. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en PBS frío con BSA al 0,5% y EDTA 2 mM. Entonces se coloca la suspensión celular sobre un portaobjetos recubierto con polilisina y se seca al aire el portaobjetos antes del análisis adicional.

- 35 Detección de células fetales de varón

Se identifican células fetales de varón aisladas usando el anticuerpo anti-TMEFF mediante FISH de XY seguido por barrido automático y validación manual tal como se describe en el ejemplo 1. Se confirma el origen fetal de las células candidatas fetales mediante FISH de colores invertidos tal como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo de referencia 4

- 40 Análisis de cromosomas de células fetales a partir de sangre materna

Se realiza el análisis para determinar síndrome de Down en células fetales a partir de sangre materna mediante FISH usando la sonda LSI 21 de Abbott Molecular. Antes de la FISH, se lava el cubreobjetos mediante incubación de 10 minutos en 2 x SSC. Entonces se aclara el portaobjetos en PBS y se deshidrata en concentraciones crecientes de etanol. Tras secar al aire, se aplican 10 µl de mezcla de sonda en la posición en el portaobjetos donde están ubicadas las células fetales y se extiende la mezcla cubriendo la zona con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. Entonces se sella el cubreobjetos con cemento de caucho y se desnaturalizan los ADN sobre una placa caliente durante 7 minutos a 83,5°C y se hibridan durante la noche en una atmósfera humidificada a 37°C. Al día siguiente, se lavan los portaobjetos hibridados a 73°C durante 2 minutos en 0,4 x SSC con Tween 20 al 0,3% seguido por 1 minuto en 2 x SSC con Tween 20 al 0,1% a temperatura ambiente. Se montan los portaobjetos en medio de montaje Vectashield que contiene DAPI 1,5 µg/ml como contratinción. Se cuenta el número de señales de FISH de cromosoma 21 presentes en las células fetales en el microscopio mediante la reubicación para las células específicas usando el archivo de barrido original.

Ejemplo de referencia 5

Identificación de ARNm expresados preferentemente en células fetales de una muestra de sangre materna,

enriquecida usando selección positiva para CD105.

Se fijan muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas, se lisan los glóbulos rojos y se permeabilizan los glóbulos blancos tal como se describe en el ejemplo 1.

5 A 500 μ l de suspensión celular se añadieron 130 μ l de microperlas con CD105 (Miltenyi) y se incubó la suspensión celular durante 60 minutos a 40C. Entonces se lavaron las células añadiendo 6 ml de tampón de MACS frío seguido por una centrifugación durante 10 minutos a 500 g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 ml de tampón de MACS frío.

10 Se aplicó la suspensión celular marcada con CD105 a una columna MS lavada previamente (Miltenyi) ya en su sitio sobre el imán y se apiló en la parte superior de una columna MS lavada previamente (Miltenyi). Cuando las células habían pasado por la columna LD, se lavó dos veces con 2 ml de tampón de MACS frío. Se lavó la columna MS con 1 ml de tampón de MACS frío. Entonces se retiró la columna LD del imán, se colocó sobre un tubo de 15 ml con recubrimiento previo y se eluyeron las células aplicando 2 veces 5 ml de tampón de MACS frío. Los primeros 5 ml de tampón pasaron por la columna sin aplicar un émbolo. Los segundos 5 ml de tampón se forzaron a pasar por la columna aplicando un émbolo. Entonces se retiró la columna MS del imán y se colocó sobre el tubo de recogida. Se
15 eluyeron las células de la misma forma que para la columna LD usando 2 veces 1 ml de tampón de MACS frío en lugar de 2 veces 5 ml de tampón. Se centrifugó el tubo de recogida a 500 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en tampón de MACS frío. Entonces se colocó la suspensión celular sobre portaobjetos recubiertos con polilisina y se secaron al aire los portaobjetos (durante la noche) antes del análisis adicional.

20 Se identificaron las células fetales de varón mediante FISH específica de cromosoma X e Y y barrido automático. Antes de la hibridación, se aclararon los portaobjetos en PBS durante 5 minutos y se deshidrataron durante 3 minutos cada uno en etanol al 60%, al 80% y al 99,9%. Para este análisis se usaron la sonda DXZ1 de repetición específica de cromosoma, CEP X, de ADN satélite alfa marcada con Spectrum Green y la sonda DYZ1, CEP Y, de satélite III marcada con Spectrum Orange (Abbott Molecular). Se prepararon mezclas de hibridación que contenían
25 ambas sondas mezclando 1 parte de la sonda de X, 1 parte de la sonda de Y, 1 parte de agua destilada y 7 partes de tampón de hibridación. Se añadieron quince μ l de mezcla de hibridación y se cubrieron mediante un cubreobjetos de 24 x 24 mm. Se sellaron los cubreobjetos con cemento de caucho y se desnaturalizaron los ADN sobre una placa caliente a 83,5C durante 7 minutos y se hibridaron durante la noche en una atmósfera humidificada a 42°C. Se lavaron los portaobjetos hibridados durante 2 minutos a 73°C en 0,4 x SSC con Tween 20 al 0,3% y durante 1
30 minuto a temperatura ambiente en 2 x SSC con Tween 20 al 0,1%. Entonces se montaron los portaobjetos en medio de montaje Vectashield con DAPI.

35 Se identificaron las células que contenían una señal de FISH roja ubicada en un núcleo teñido con DAPI mediante barrido automático usando dos tipos diferentes de dispositivos de barrido. El sistema de barrido de portaobjetos MDS (versión 5.8.0) desarrollado originalmente por Applied Imaging, y el sistema de barrido MetaCyte desarrollado por Metasystems. Con el sistema de barrido MDS, se sometieron a barrido los portaobjetos a ampliación de 20X usando la función de barrido 5. Con MetaCyte, se sometieron a barrido los portaobjetos a ampliación de 10x usando un clasificador desarrollado y optimizado de manera interna para la detección de verdaderas señales de FISH de Spectrum Orange. Tras el barrido, se inspeccionaron visualmente las células identificadas por el dispositivo de barrido mediante reubicación automática. Las células que tenían una señal en X verde y una señal en Y naranja
40 significativamente mayor que la señal en X se clasificaron como células fetales de varón.

Se aíslan 98 células fetales de varón positivas para CD105 dos veces mediante una FISH de XY y 980 células maternas circundantes dos veces mediante microdissección láser y catapultado por presión tal como se describe en el ejemplo 1. Se amplifica el ARN de las dos muestras fetales y las dos muestras control por Miltenyi Biotec mediante su SuperAmp Service, y se usan los ADNc amplificados para obtener dos micromatrices de células madre PIQOR™ (duplicado biológico), tal como se describe en el ejemplo 1.
45

A partir de los resultados de las micromatrices PIQOR, se seleccionan 24 genes adicionales (tabla 2) basándose en 3 criterios diferentes. En primer lugar, el gen debe mostrar una razón señal fetal/materna alta o relativamente alta en ambas matrices PIQOR obtenidas a partir de células fetales positivas para CD105 hibridadas una vez (el duplicado biológico). Además, el gen debe mostrar una razón señal fetal/materna alta o relativamente alta en al menos una de las dos matrices PIQOR obtenidas a partir de las 23 células fetales no enriquecidas hibridadas dos veces (el duplicado técnico). Finalmente, el gen debe mostrar una expresión muy baja o ausencia de la misma en sangre completa.
50

Tabla 2

Símbolo de gen	Número de registro	Definición	Razón: señal fetal/señal materna (matrices PIQOR)
THBD (CD141)	NM_000361	Gen de trombosmodulina (THBD) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	2,06 / 33% 1,92 / 36%

ES 2 533 861 T3

			0,97 / 52% 1,87 / 47%
FLT3 (CD135)	NM_004119	Gen de tirosina cinasa 3 relacionada con fms (FLT3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	2,32 / 30% 1,83 / 11% 1,92 / 58% 2,00 / 21%
F3 (CD141)	NM_001993	Gen de factor de coagulación III (tromboplastina, factor tisular) (F3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	2,66 / 46% 2,10 / 25% 1,87 / 60% 1,87 / 14%
MCAM (CD146)	NM_006500	Gen de molécula de adhesión de células de melanoma (MCAM) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	4,23 / 20% 2,94 / 17% 2,60 / 48% 3,07 / 29%
CD33	NM_001772	Gen de molécula de CD33 (CD33) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm.	5,38 / 7% 4,07 / 9% 8,57 / 38% 7,69 / 50%
CD68	NM_001040059 NM_001251	Gen de molécula de CD68 (CD68) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1 y variante de transcrito 2, ARNm.	2,42 / 37% 2,19 / 16% 2,35 / 31% 2,00 / 34%
CDH5 (CD144)	NM_001795	Gen de cadherina 5, tipo 2 (endotelio vascular) (CDH5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	0,69 / -% 0,71 / -% 1,84 / 36% 2,00 / 104%
SELE (CD62E)	NM_000450	Gen de selectina E (SELE) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	1,43 / 16% 2,11 / 24% 3,51 / 53% 2,98 / 27%
GJA5 (GAP)	NM_181703	Gen de proteína de unión gap, alfa 5, 40 kDa (GJA5) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito B, ARNm.	1,95 / 45% 1,82 / 21% 0,97 / 49% 1,24 / 39%
ITGA5	NM_002205	Gen de integrina, alfa 5 (receptor de fibronectina, polipéptido alfa) (ITGA5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	3,25 / 33% 2,51 / 17% 1,88 / 53% 2,25 / 56%
KCNK3 (TASK-1)	NM_002246	Gen del canal de potasio, subfamilia K, miembro 3 (KCNK3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	2,04 / 37% 1,90 / 28% 1,73 / 40%
CNTRF	NM_001842 NM_147164	Gen de receptor del factor neurotrófico ciliar (CNTRF) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1 y variante de transcrito 2, ARNm.	3,31 / 28% 2,62 / -% 3,49 / 53%
F11R (JAM-1)	NM_016946	Gen de receptor F11 (F11R) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	4,43 / 30% 3,56 / 22% 2,52 / 3% 3,32 / 55%
SDC4 (Syndecan 4)	NM_002999	Gen de syndecan 4 (SDC4) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	2,01 / 11% 1,73 / 40% 2,19 / 19%
ACVR2B	NM_001106	Gen de receptor de activina A, tipo IIB (ACVR2B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	1,90 / 0% 1,48 / 9% 1,39 / 41% 1,74 / 27%
ACVR2A	NM_001616	Gen de receptor de activina A, tipo IIA (ACVR2A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	1,30 / 17% 2,08 / 23% 2,60 / 44% 1,76 / 30%
CD44 (CD44v6+ CD44v4/5)	NM_000610 NM_001001389	Gen de molécula de CD44 (grupo sanguíneo indio) (CD44) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1 y variante de transcrito 2, ARNm.	1,30 / 24% 3,23 / 77% 7,09 / 75%

ES 2 533 861 T3

			1,96 / 48%
STX1A	NM_004603	Gen de sintaxina 1A (cerebro) (STX1A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	5,09 / 26% 4,23 / 62% 4,80 / 55%
TEK (Tie2)	NM_000459	Gen de TEK tirosina cinasa endotelial (TEK) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	2,13 / 31% 2,23 / 55% 2,37 / 65%
L1CAM (CD171)	NM_000425 NM_024003	Gen de molécula de adhesión celular L1 (L1 CAM) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1 y variante de transcrito 2, ARNm.	1,98 / 35% 2,37 / 22% 2,37 / 61% 2,18 / 28%
NCAM1 (CD56)	NM_000615 NM_001076682 NM_181351	Gen de molécula de adhesión celular neuronal 1 (NCAM1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, variante de transcrito 2 y variante de transcrito 3, ARNm.	0,90 / -% 1,60 / 17% 3,83 / 54% 2,10 / 27%
ALPP	NM_001632	Gen de fosfatasa alcalina, placentaria (isozima de Regan) (ALPP) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	1,63 / -% 1,83 / 13% 3,10 / 52% 1,70 / 93%
ALPPL2	NM_031313	Gen de fosfatasa alcalina, de tipo placentario 2 (ALPPL2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm.	1,16 / 82% 5,46 / 44% 7,91 / 22% 2,26 / 61%
MMP23B (y MMP23A)	NM_006983 NR_002946	Gen de metalopeptidasa de la matriz 23B (MMP23B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm. Gen de metalopeptidasa de la matriz 23A (pseudogén (MMP23A) de <i>Homo sapiens</i> , ARN no codificante.	0,86 / 52% 1,11 / 56% 2,80 / 67% 2,05 / 54%

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de una célula fetal que comprende las etapas de
 - a. proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma
 - b. fijar las células
 - 5 c. poner en contacto la muestra con
 - i. una sonda de hibridación dirigida a un ácido nucleico que comprende al menos 10 pb de un gen expresado de manera diferencial en células fetales de una muestra de sangre materna en el que el gen es TMEFF2 o
 - 10 ii. un ligando dirigido a un antígeno codificado por un gen expresado de manera diferencial en células fetales de una muestra de sangre materna en el que el gen es TMEFF2.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de identificación de células fetales de la muestra o una etapa de enriquecimiento de células fetales de la muestra.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la identificación comprende detectar la presencia del ligando o la sonda de hibridación sobre o en las células fetales.
- 15 4. Método según la reivindicación 2, en el que el enriquecimiento comprende poner en contacto la muestra de sangre materna con un ligando dirigido a un antígeno expuesto en la superficie celular codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en tomorregulina, EDN1, AHNAK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de ratón, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 y MMP23A/MMP23B.
- 20