(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 543 709**

(51) Int. CI.:

G01N 33/38 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2002 E 02740785 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1383926**

(54) Título: **Procedimiento de diagnóstico prenatal en célula fetal aislada de sangre materna**

(30) Prioridad:

30.04.2001 FR 0105824

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.08.2015

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS (33.3%) y
UNIVERSITE RENE DESCARTES (PARIS V) (33.3%)

(72) Inventor/es:

PATERLINI-BRECHOT, PATRIZIA

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Procedimiento de diagnóstico prenatal en célula fetal aislada de sangre materna

La presente invención está relacionada con un nuevo procedimiento de diagnóstico prenatal no invasivo aplicado a partir de una muestra de sangre materna. Dicho procedimiento permite el diagnóstico prenatal en células fetales epiteliales no apoptóticas aisladas de sangre materna después de su enriquecimiento por filtración, su análisis morfológico o inmunológico y genético. Las ventajas de este procedimiento son, en particular, su inocuidad para la madre o el feto y la muy alta sensibilidad y especificidad del diagnóstico. Permite la detección precoz de una anomalía genética o cromosómica del feto, de una patología genética o infecciosa (vírica, bacteriana o parasitaria) del feto, de un genotipo preciso y, en particular, del sexo genético del feto.

Los procedimientos de diagnóstico prenatal apuntan especialmente a obtener informaciones genéticas sobre un feto o un embrión. La búsqueda de informaciones genéticas sobre un feto consiste, o bien en identificar la presencia de un alelo específico de un gen dado o de una combinación de alelos sobre una secuencia dada de ADN fetal, o bien en asociar genéticamente un polimorfismo del ADN fetal con un alelo particular. Una de las aplicaciones principales del diagnóstico genético prenatal se refiere a la detección de anomalías congénitas.

Los procedimientos de diagnóstico genético prenatal usados clínicamente comprenden esencialmente técnicas invasivas como amniocentesis, extracción de vellosidades coriónicas, extracción de sangre fetal o biopsias de tejido. El conjunto de estas técnicas implica que se obtienen las muestras directamente del feto o indirectamente de las estructuras ovulares. Teniendo en cuenta el carácter muy invasivo de estos procedimientos, estos son susceptibles de complicaciones para la madre o el feto. Entre estas complicaciones, se citará en el caso de la amniocentesis el riesgo de infección, de hemorragia fetomaterna con posible aloinmunización, de pérdidas de líquidos amnióticos o de dolores abdominales. Según los estudios, el riesgo estimado de aborto después de una extracción por amniocentesis es de 0,2 a 2,1 % superior al de un grupo de control. Por consiguiente, la amniocentesis solo se propone a mujeres en las que el riesgo de tener un hijo con una minusvalía genética supera el de aborto yatrogénico.

Con el fin de limitar el uso de técnicas invasivas de diagnóstico prenatal que presentan los riesgos de complicaciones mencionados anteriormente y que son generalmente desagradables y/o fuente de estrés para la madre, el desarrollo de nuevos procedimientos no invasivos constituye una apuesta importante de la obstetricia moderna.

Las células fetales circulantes en la sangre materna constituyen en particular una fuente de material genético potencialmente utilizable para el diagnóstico genético prenatal (1, 2).

Efectivamente, en el transcurso del embarazo, diferentes tipos celulares de origen fetal atraviesan la placenta y circulan por la sangre materna (1). Estos tipos celulares incluyen células linfoides y eritroides, precursores mieloides y células epiteliales trofoblásticas (citotrofoblastos y sinciotrofoblastos).

Se describen en el estado de la técnica procedimientos de análisis del genoma de células fetales circulantes en la sangre materna con vistas a un diagnóstico prenatal, pero estos continúan estando relativamente limitados en términos de sensibilidad y especificidad del diagnóstico (3, 4, 5, 6). El interés del desarrollo de un procedimiento de diagnóstico prenatal no invasivo y altamente específico da como resultado la posibilidad de disminuir mediante dicho ensayo la proporción de diagnósticos invasivos indicados en mujeres embarazadas y cuyo resultado es finalmente negativo. A modo de ejemplo, en el caso de la trisomía 21, que afecta a una mujer de cada 700, actualmente en Francia solo se ofrece un diagnóstico prenatal si la edad de la madre es igual a 38 años, mientras que a las mujeres más jóvenes se les propone un ensayo de cribado bioquímico capaz de detectar un 60 % de las trisomías 21 a expensas de una tasa de amniocentesis del 5 %. Sin embargo, aún un 40 % de los casos de trisomía 21 no son detectados por los ensayos actualmente disponibles. Se ha descrito recientemente la detección prenatal de la trisomía 21 en células fetales aisladas del plasma materno usando la técnica FISH. Este enfoque es interesante, pero las células fetales eran raras en el plasma (1 de cada 500 a 1 de cada 2000) e incluían a menudo células apoptóticas; un diagnóstico fiable requeriría la aplicación del procedimiento a un gran número de células, haciendo imposible una aplicación rutinaria. Además, las células fetales euploides no pueden identificarse mediante este enfoque.

Una de las limitaciones de estos enfoques procede del hecho de que las células fetales circulantes en la sangre están presentes a muy baja concentración. Los estudios basados en la detección por PCR del cromosoma Y en muestras de sangre sin selección previa han permitido evaluar el número medio de células fetales en aproximadamente 1 célula por mililitro de sangre (7). Por otro lado, se ha mostrado que las células fetales de origen mieloide o linfoide (CD34 o CD38 positivas) siguen presentes en la sangre materna hasta 27 años después de un embarazo o un aborto (8). Su aislamiento no se asocia por tanto a la certidumbre de que derivan del embarazo en curso. Se conciben por tanto fácilmente las dificultades técnicas del desarrollo de un diagnóstico prenatal en sangre materna utilizable rutinariamente y la necesidad de concentrar las células fetales epiteliales (trofoblásticas) que se destruyen después de cada embarazo y que permiten analizar el genoma fetal del embarazo en curso.

Varios autores han propuesto sin embargo mejorar la sensibilidad de la detección de células fetales en la sangre materna mediante el enriquecimiento de la población celular contenida en la sangre materna en células fetales o mediante la separación de las células fetales contenidas en la sangre materna (para revisión, 1, 2).

En particular, el estado de la técnica comprende la enseñanza de procedimientos de separación de células fetales circulantes basados en sus propiedades de afinidad frente a ciertos anticuerpos.

Se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 97/42503 (BIOCOM S.A.) un procedimiento de inmunoseparación magnética de células fetales consistente en fijar las células fetales sobre bolas paramagnéticas sobre las que se han fijado anticuerpos dirigidos contra antígenos expresados en la superficie de células fetales. Se describe también en la patente WO90/06509 (Flinders Technologies Pty, Ltd) un procedimiento de aislamiento de células trofoblásticas para el diagnóstico prenatal con la ayuda de anticuerpos que reconocen antígenos expresados en la superficie de células trofoblásticas. Sin embargo, no se ha puesto de manifiesto hasta ahora ningún anticuerpo específico exclusivamente de células fetales. Este punto es importante, pues el diagnóstico prenatal debe efectuarse sobre una población celular fetal “pura”.

A modo de ejemplos de procedimientos de enriquecimiento de una población de células originarias de sangre materna en células fetales, se citarán en particular las patentes US 5.714.325 (New England Medical Center Hospitals), US 5.580.724 (Board of Regents, The University of Texas System) y US 5.646.004 (Activated Cell Therapy, Inc.).

La patente US 5.714.325 enseña un procedimiento de enriquecimiento en granulocitos fetales mediante separación de los granulocitos fetales de las células maternas con la ayuda de anticuerpos que reconocen antígenos expresados en la superficie de los granulocitos fetales, en particular con la ayuda de la combinación de un anticuerpo anti-CD71 (receptor de transferrina) y de un anticuerpo antiglicoforina A.

La patente US 5.580.724 describe otro procedimiento de enriquecimiento en células fetales de una población de células originarias de sangre materna mediante estimulación *in vitro* de la proliferación de células fetales con la ayuda de factores de crecimiento específicos.

El enriquecimiento en células fetales puede realizarse también mediante centrifugación de una muestra de sangre en una solución con gradiente de densidad (PERCOLL, FICOLL, albúmina, sacarosa o dextrano, por ejemplo) como se describe en la patente US 5.646.004.

Sin embargo, se comprueba que estos protocolos que comprenden varias etapas de aislamiento pueden dañar las células fetales y dar lugar a pérdidas celulares significativas. Además, ninguno de estos procedimientos permite un enriquecimiento de la población de células originarias de la sangre materna en células fetales que sea suficientemente alto para plantearse rutinariamente un diagnóstico prenatal, específico y sensible. La sensibilidad de un diagnóstico en células fetales (y por tanto su fiabilidad) está de hecho correlacionado directamente con la pureza de las preparaciones de células fetales usadas para el diagnóstico. Ahora bien, ninguno de los procedimientos de enriquecimiento citados anteriormente permite la obtención de poblaciones de células fetales no apoptóticas y suficientemente puras, en particular no exentas de células de origen materno.

Por consiguiente, existe una necesidad real de desarrollar nuevos procedimientos de diagnóstico no invasivos cuya sensibilidad y especificidad de diagnóstico sean muy elevadas y, preferiblemente, cercanas al 100 %.

A la vista del estado de la técnica y de la naturaleza de las células fetales circulantes en la sangre materna, la invención es el resultado de la comprobación de que solo un procedimiento que permita una concentración suficiente de células fetales, asociado a su examen morfológico y al análisis genético orientado al genoma de células únicas, es susceptible de superar los inconvenientes de los procedimientos existentes.

Se describe en la solicitud de patente FR 2.782.730 un procedimiento de separación de células epiteliales patogénicas circulantes en la sangre, y en particular de células tumorales, mediante filtración de una muestra de líquido biológico. Este se basa en la comprobación de que el tamaño de las células epiteliales circulantes es superior al de las células leucocíticas. Vona *et al.* (9) usaron este procedimiento de filtración para detectar e identificar diferentes líneas celulares cancerosas mezcladas a muy baja concentración en una muestra de sangre (1 a 3 células por mililitro de sangre), así como células tumorales aisladas de pacientes aquejados de cáncer de hígado.

Los inventores han mostrado ahora que es posible combinar el procedimiento de filtración de células descrito por Vona *et al.,* el análisis inmunológico o citológico de las células retenidas por filtración y un procedimiento de análisis genético orientado a células individuales para obtener un enriquecimiento suficiente de las células de origen fetal y la aplicación de un diagnóstico prenatal en el genoma de células fetales individuales aisladas de sangre materna y cuyo origen fetal se demuestra claramente. En particular, la presente invención permite enriquecer una población de células originarias de sangre materna en células fetales epiteliales por un factor superior a 6 millones. Es efectivamente posible detectar mediante el procedimiento de la invención de 1 a 7 células fetales por 2 ml de sangre

materna analizada. Teniendo en cuenta estos datos, puede concluirse por tanto que el procedimiento de la invención permite aislar la casi totalidad de las células fetales presentes en la sangre materna. Además, después de la filtración y recogida de las células por microdisección, los inventores mostraron que es posible observar dos tipos celulares característicos, uno mononucleado de tipo citotrofoblasto de un diámetro comprendido entre 14 y 20 µm aproximadamente y otro plurinucleado de tipo sincitiotrofoblasto de un diámetro de aproximadamente 44-47 µm o más.

Un estudio conducido en 13 mujeres con 11-12 semanas de embarazo demostró que es posible diagnosticar el sexo masculino de los fetos mediante el análisis de 2 ml de sangre materna a través de la detección de secuencias específicas del cromosoma Y en el genoma de células únicas microdisecadas. Se ha mostrado además que es posible determinar por alelotipado el origen fetal o materno de estas mismas células aisladas.

Así, la presente invención deriva, en parte, del descubrimiento de que las células fetales pueden concentrarse mediante la aplicación del procedimiento de filtración tal como se describe en la solicitud FR 2.782.730. La invención deriva también en parte de la demostración de que el análisis morfológico de las células retenidas en el filtro permite establecer una presunción sobre el origen fetal o materno de estas células y su análisis genético permite la demostración de su origen fetal o materno. En particular, demuestra que puede realizarse un diagnóstico prenatal en un genoma fetal puro, obtenido mediante microdisección de células únicas. Finalmente, la invención deriva de la demostración de que el procedimiento de diagnóstico prenatal puede aplicarse a un periodo precoz del embarazo y a un volumen limitado de sangre materna extraída.

Hay que entender por “diagnóstico prenatal” tanto la búsqueda de una característica particular del feto (por ejemplo el sexo) como también la búsqueda de una anomalía genética o de cualquier tipo de patología genética (alteración del ADN), infecciosa (vírica, bacteriana o parasitaria) o metabólica (alteración de la síntesis de ARN mensajeros y/o de proteínas) que puedan detectarse a partir del análisis genético de células fetales aisladas.

Así, según los modos de realización de la invención elegidos, el diagnóstico prenatal consiste en buscar una anomalía genética o cromosómica en el ADN de una célula fetal, una patología genética o infecciosa (vírica, bacteriana o parasitaria) o un genotipo preciso, y en particular el sexo genético del feto.

Hay que entender por “procedimiento poco invasivo o no invasivo” un procedimiento que no implica extracción de tejidos o células fetales por biopsia y/o rotura de la barrera placentaria.

Así, la invención hace referencia a un procedimiento de diagnóstico prenatal en células fetales aisladas de sangre materna que comprende las etapas siguientes:

a) la filtración de una muestra de sangre materna pura o diluida, de forma que se concentren en un filtro según su tamaño ciertas células circulantes y en particular células de origen fetal;
b) el análisis de las células retenidas en el filtro con el fin de obtener una presunción o una identificación de su origen fetal o materno; y la identificación de su naturaleza epitelial;
c) la demostración del origen fetal de ciertas células enriquecidas mediante análisis genético de células aisladas individualmente;
d) la búsqueda de anomalías genéticas orientada específicamente a genomas celulares analizados individualmente y cuyo origen fetal se ha demostrado.

El diagnóstico prenatal, para ser fiable, debe realizarse en un genoma fetal puro. El término “presunción” o “presunto” en la etapa (b) indica por tanto la alta probabilidad de estar en presencia de una célula de origen fetal.

En la etapa (c), el análisis se realiza preferiblemente mediante análisis genético con la ayuda de marcadores específicos de los genomas fetales, como se explica esto con detalle a continuación.

La o las características de las células fetales susceptibles de buscarse en la etapa (d) pueden ser, o bien una anomalía genética o cromosómica del feto, o bien un genotipo particular de este último.

La búsqueda de esta característica particular se realiza, preferiblemente, mediante análisis genético en células únicas cuyo origen fetal se demostró anteriormente.

Para las necesidades del diagnóstico prenatal según la invención, se extrae una muestra de sangre de la mujer embarazada. En un modo de realización particular de la invención, se extrae una muestra de sangre materna precozmente en el transcurso del embarazo (por ejemplo, alrededor de la quinta semana de embarazo). Sin embargo, la extracción de muestra de sangre materna y el procedimiento de diagnóstico según la invención pueden realizarse en cualquier momento, desde el inicio hasta el final del embarazo. En un modo de realización preferido de la invención, la extracción y el procedimiento de diagnóstico se realizan entre la 7ª y la 15ª semana de embarazo. En otro modo de realización, la extracción y el procedimiento de diagnóstico se realizan entre la 10ª y la 15ª semana de embarazo. Se extraerán generalmente entre 3 y 20 ml de sangre materna, preferiblemente entre 5 y 10 ml. Si, por razones prácticas, se extraen entre 3 y 20 ml de sangre materna, hay que entender que el análisis posterior de las

células fetales aisladas descrito a continuación puede realizarse con un volumen de muestra de sangre extraída más limitado, por ejemplo comprendido entre 1 y 10 ml, preferiblemente entre 2 y 5 ml. Con el fin de aumentar la sensibilidad del diagnóstico, es posible realizar varias extracciones independientes con el fin de repetir el diagnóstico en diferentes muestras independientes. Además, en un modo de realización preferido de la invención, es posible extraer en paralelo una muestra de sangre del padre y una muestra de células de la madre, por ejemplo por extracción de células bucales por "raspado" o de sangre antes del embarazo, y realizar a partir del material extraído una búsqueda de marcadores específicos del genoma paterno y del genoma materno. Este estudio paralelo permite identificar marcadores genéticos específicos del padre y de la madre, que podrían utilizarse para demostrar el origen fetal de las células aisladas por filtración según el modo de realización descrito a continuación.

La invención es especialmente el resultado de la observación de que las células fetales epiteliales circulantes en la sangre tienen un diámetro superior a las células leucocíticas y eritrocíticas maternas y pueden aislarse según procedimientos de filtración adaptados de los descritos para el aislamiento de células patogénicas circulantes en la sangre tales como los descritos en la solicitud de patente FR 2782730.

Así, según el procedimiento de la invención, se filtra la muestra de sangre extraída de forma que se concentren en el filtro, según su tamaño, ciertas células circulantes de origen fetal o materno y se separen así de las células sanguíneas, en particular leucocitos maternos.

Previamente a la etapa (a) de filtración, puede aplicarse cualquier procedimiento que permita el enriquecimiento de la población celular originaria de la muestra de sangre en células de origen fetal. En una forma de realización de la invención, se realiza un enriquecimiento de la población en células fetales mediante la clasificación de las células en función de la expresión de marcadores de superficie expresados por células fetales para disminuir la proporción de células de origen materno. Las técnicas de clasificación son, por ejemplo, FACS, clasificación en columna de inmunoafinidad o inmunomagnética (MACS) o cualquier técnica susceptible de obtener un enriquecimiento de un tipo celular basándose en las características físicas (densidad) o estructurales (antígenos específicos especialmente).

Con el fin de facilitar la filtración, en un modo de aplicación particular se procede antes de la etapa de filtración a la dilución de la muestra de sangre en una solución de filtración, consistente dicha solución de filtración en un reactivo de fijación de células nucleadas y/o de lisis de glóbulos rojos. Un ejemplo de solución de filtración comprende un detergente capaz de degradar la membrana de los glóbulos rojos, tal como saponina, y un fijador capaz de estabilizar la membrana de células nucleadas tal como formaldehído.

En un modo de aplicación preferido, se diluye la muestra de sangre materna de 10 a 100 veces aproximadamente en la solución de filtración.

Se realiza la filtración de la muestra de sangre materna pura o diluida con la ayuda de un filtro poroso que permite separar las células según su tamaño. La porosidad del filtro se elige de manera que deje pasar los elementos que figuran en la sangre, especialmente eritrocitos, plaquetas y leucocitos maternos, y que retenga ciertas células nucleadas y en particular células grandes (epiteliales o precursoras hematopoyéticas) de origen materno y fetal.

Ventajosamente, se usa un filtro de porosidad comprendida entre 6 y 15 µm y una densidad adaptada según la porosidad elegida y apta para retener las células evitando la colmatación de estas en la filtración. Preferiblemente, el filtro presenta poros sensiblemente cilíndricos de un diámetro de aproximadamente 8 µm y de densidad comprendida entre $5x10^4$ y $5x10^5$ poros/cm^2. De manera más preferida, el filtro utilizado se calibra de forma que el conjunto de poros presente un diámetro sensiblemente idéntico. Es un ejemplo de filtro utilizable en el procedimiento de la invención una membrana filtrante calibrada de policarbonato de tipo "membrana con revelado de trazas nucleares" de una densidad de poros de $1x10^5$ poros/cm^2, de un grosor de 12 µm y de un tamaño de poros de 8 µm, tal como la comercializada por Whatman®.

Las células retenidas en el filtro pueden observarse bajo el microscopio, por ejemplo después de coloración con hematoxilina y eosina, de manera que se analice su morfología. Puede identificarse su naturaleza epitelial, a modo de ejemplo, mediante inmunomarcaje con un anticuerpo anticitoqueratinas (de tipo KL_1). Es posible en este estado considerar el reconocimiento basándose en los caracteres morfológicos de las células de origen fetal y, en particular, las células citotrofoblásticas mononucleadas que presentan un gran núcleo, cromatina condensada y un citoplasma reducido de un diámetro comprendido entre 14 y 20 µm, y las células sincitiotrofoblásticas de un mayor diámetro (44-47 µm o más) y plurinucleadas.

El análisis genético de las células retenidas en el filtro permite obtener indicaciones sobre el origen fetal o materno de cada una de estas células. En particular, con vistas a un diagnóstico sensible y específico, se repetirá la etapa de filtración si no se observa ninguna célula presuntamente de origen fetal en el filtro después de una primera filtración. Según los modos de realización, se establecerá el análisis genético en el conjunto de células retenidas en el filtro y que comprende ciertas células cuyo origen fetal se supone, o en el genoma de las células aisladas individualmente.

En un modo de aplicación particular, se procede al análisis de la presunción del origen fetal o materno de las células retenidas en el filtro mediante la búsqueda de la presencia de un marcador o marcadores inmunológicos o citológicos característicos de las células fetales.

Se entiende por marcador inmunológico característico de células fetales cualquier antígeno o combinación de antígenos cuya expresión sea significativamente diferente entre las células fetales y las células maternas, y que pueda detectarse con la ayuda de un anticuerpo o de una combinación de anticuerpos dirigidos específicamente contra dicho antígeno o combinación de antígenos. Son ejemplos de dichos marcadores inmunológicos, en particular, los antígenos asociados a células trofoblásticas descritos en la solicitud de patente WO 90/06509. La búsqueda de la presencia de marcadores inmunológicos característicos de las células fetales consiste, por ejemplo, en:

- la puesta en contacto de células contenidas en la muestra de sangre materna con al menos un anticuerpo dirigido contra un antígeno característico de células fetales; y
- la determinación en las células retenidas en el filtro de un enlace específico de dicho anticuerpo con un antígeno expresado en la superficie de dichas células,

pudiendo realizarse dicha puesta en contacto de las células con el anticuerpo antes o después de la etapa de filtración. Los anticuerpos elegidos pueden ser de tipo policlonal o monoclonal.

Es un ejemplo de antígeno característico de células fetales el antígeno de fosfatasa alcalina placentario.

En otro modo de aplicación, se puede proceder al análisis de la presunción del origen fetal de las células mediante la determinación de los marcadores citológicos específicos de células citotrofoblásticas y/o sincitiotrofoblásticas. Los marcadores citológicos utilizables comprenden el conjunto de características citológicas de las células fetales que permiten diferenciarlas de otros tipos de células circulantes susceptibles de retenerse en el filtro, en particular el tamaño de las células, la forma de las células, la presencia y el tamaño de orgánulos particulares, el tamaño y número de núcleos, la estructura de la cromatina, etc., o cualquier combinación particular de estas características citológicas. Los caracteres citológicos pueden observarse mediante la coloración de las células con la ayuda de colorantes usados clásicamente en citología, en particular hematoxilina-eosina, y por la observación de las células marcadas bajo el microscopio óptico.

Para la búsqueda de una anomalía cromosómica o del sexo del feto, en un modo de aplicación particular, se procede a la hibridación *in situ* de sondas específicas de la anomalía cromosómica o del sexo para detectar con el genoma de las células retenidas en el filtro, y a la búsqueda de una hibridación específica en el genoma de células cuyo origen fetal se supone. Las sondas específicas de una secuencia cromosómica pueden ser especialmente sondas de ADN o de tipo PNA (ácido peptidonucleico) (11). Es conocido un ejemplo de técnica de hibridación *in situ* con el nombre de procedimiento FISH (hibridación por fluorescencia *in situ*) (10), pero puede utilizarse en el marco del procedimiento de la invención cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia que permita detectar en el genoma de una célula una anomalía cromosómica o los cromosomas sexuales con la ayuda de sondas específicas.

Se citan a modo de ejemplos de anomalías cromosómicas que pueden detectarse la trisomía 13, la trisomía 18, la trisomía 21, el síndrome de Turner, el síndrome Penta X, el síndrome XYY o el síndrome de Klinefelter.

En otro modo de realización particularmente preferido de la invención, después del análisis de la presunción del origen fetal o materno de las células, se recogen individualmente las células cuyo origen fetal se supone. Hay que entender por recogida individual de las células cualquier procedimiento que permita recoger una célula individual específica retenida en el filtro con vistas a su análisis posterior independientemente de las demás células retenidas en el filtro. En un modo de realización preferido, se recogen las células retenidas en el filtro individualmente mediante microdisección. La recogida individual de una célula mediante microdisección consiste en cortar con láser la parte de la membrana filtrante sobre la que está retenida una célula, o despegar la célula del filtro con la ayuda del láser, y recuperar después la célula única recogida en un tubo apropiado. Esta es entonces apta para experimentar los diferentes análisis que permiten el diagnóstico prenatal tales como los expuestos a continuación.

La recogida individual de células permite orientar ventajosamente el análisis genético al genoma de una célula única. Permite además realizar la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular del mismo en el genoma de una célula única cuyo origen fetal se ha demostrado anteriormente mediante análisis genético. Así, mediante este modo de realización de la invención, se obtiene de manera ventajosa material genético puro, es decir, derivado de una célula única, y utilizable a la vez para la demostración del origen fetal de la célula analizada y después para la búsqueda eventual de una anomalía genética o de una característica de la misma o de un genotipo particular.
Puede realizarse cualquier tipo de procedimiento de análisis genético para demostrar el origen fetal o materno de una célula única recogida o proceder a la búsqueda de anomalías genéticas del feto o de un genotipo particular del mismo cuando estos procedimientos son suficientemente sensibles para identificar en una célula única el o los caracteres buscados.

Es un procedimiento de análisis preferido para la demostración del origen fetal el análisis por alelotipado del ADN de las células recogidas, en particular mediante la identificación de marcadores microsatelitales específicos del ADN paterno y materno.

Por consiguiente, es posible realizar

- la demostración del origen fetal o materno de las células y después,
- el diagnóstico prenatal mediante la búsqueda de anomalías genéticas o cromosómicas del feto o de un genotipo particular del mismo,

mediante la identificación en una preparación de ADN derivado de una célula única recogida de uno o varios marcadores/dianas genéticos o de polimorfismo o de una combinación de estos marcadores/dianas o de una carga alélica particular de estos marcadores o de una diana genética.

En el texto siguiente, se preferirá el término “diana genética” para hacer referencia a la característica genética buscada, incluyendo polimorfismo, en el marco del diagnóstico prenatal, y el término “marcador” para hacer referencia a los elementos que permiten la demostración del origen fetal o materno de las células analizadas.

Se entiende por diana genética cualquier característica genética, por ejemplo una mutación particular de un gen, asociada específicamente a un fenotipo o a una patología genética o infecciosa del feto.

Hay que entender por marcador de polimorfismo cualquier característica identificable en el ADN cuya presencia se correlacione con un genotipo particular. Estos marcadores permiten distinguir el ADN paterno del ADN materno y demostrar por tanto la composición biparental del ADN fetal. Se pueden citar, por ejemplo, los marcadores de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), los marcadores de SNP (polimorfismo de nucleótido simple), los marcadores microsatelitales, los marcadores de VNTR (número variable de repeticiones en tándem) o de STR (repeticiones cortas en tándem).

Los marcadores microsatelitales son particularmente preferidos para la caracterización de las células y la aplicación del diagnóstico prenatal. En un modo de realización de la invención, es al menos un marcador de polimorfismo para identificar un marcador microsatelital, un marcador de VNTR (número variable de repeticiones en tándem) o un marcador de STR (repeticiones cortas en tándem). Estos presentan efectivamente la ventaja de ser identificables mediante amplificación con la ayuda de cebadores específicos. Los marcadores microsatelitales,de VNTR o STR, están compuestos por repeticiones en tándem, lo más a menudo de los motivos poliCA/GT. Las variaciones alélicas, debidas a la variación del número de repeticiones, son fácilmente detectadas mediante amplificación de tipo PCR, gracias al uso de cebadores correspondientes a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Se describen un mapa físico de estos marcadores microsatelitales y la secuencia de sus cebadores asociados por Dib *et al.* (12). Mediante esta metodología, la puesta de manifiesto de una contribución biparental al genotipo de las células analizadas permite establecer de manera cierta el origen fetal de las células analizadas. Además, puede buscarse específicamente la presencia de marcadores microsatelitales particulares, especialmente como diana genética para el diagnóstico prenatal, especialmente para el diagnóstico de alteraciones cromosómicas particulares.

Con el fin de demostrar el origen fetal o materno de una célula única recogida, en un modo de aplicación particular se procede a la búsqueda de un marcador o de una combinación de marcadores o de una carga alélica de estos marcadores que se distinga de los del genoma de células maternas, en particular por la búsqueda en el genoma de dicha célula recogida de un marcador o de una combinación de marcadores específico del ADN de células paternas. Su presencia es necesariamente la certificación del origen fetal de la célula en cuestión.

En el caso en que el sexo del feto sea conocido y de sexo masculino, puede ser un marcador específico del ADN de las células fetales un marcador genético específico del cromosoma Y o una combinación de dichos marcadores.

Ventajosamente, antes de la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida y/o de la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este, se lisa dicha célula recogida y se preamplifica el conjunto de su genoma, por ejemplo con la ayuda de cebadores genéricos que cubren todas las secuencias posibles según los procedimientos conocidos de preamplificación por extensión de cebadores (PEP, Primer Extension Preamplification) (13) o también el procedimiento PCR-DOP. Estos procedimientos permiten amplificar la totalidad del genoma de una sola célula. La preparación de ADN preamplificado así obtenida y derivada del ADN de una célula única puede purificarse y usarse entonces como material genético para la detección específica de marcadores genéticos o de polimorfismo y/o la detección de una diana genética.

De manera preferida, se procede a la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida mediante la amplificación de marcadores genéticos o de polimorfismo o de una combinación de estos marcadores a partir de la preparación de ADN preamplificado derivada del ADN de una célula única. Los marcadores genéticos capaces de poner de manifiesto la contribución biparental al ADN fetal se identifican mediante el análisis previo del ADN paterno y materno. Se puede proceder a la búsqueda de una diana genética con vistas al diagnóstico prenatal a partir de la

misma preparación de ADN preamplificado derivada del ADN de una célula única mediante la amplificación de una o varias secuencias portadoras de la diana o dianas genéticas buscadas. Puede usarse en el procedimiento de la invención cualquier técnica que permita la amplificación específica de un ácido nucleico dado. Se cita a modo de ejemplo el procedimiento de amplificación PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o los procedimientos de amplificación isotérmica tales como TMA (amplificación mediada por transcripción), NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico), 3SR (replicación de secuencia automantenida) o amplificación por desplazamiento de hebra (strand displacement amplification).

Los procedimientos de amplificación, y en particular el procedimiento de PCR, son suficientemente sensibles para aplicarse a partir de menos de un quinto de la preparación de ADN preamplificado. Por consiguiente, cada preparación de ADN preamplificado de una célula recogida puede usarse para la amplificación de 5 marcadores o dianas genéticas diferentes al menos.

En particular, las amplificaciones realizadas permiten la detección de marcadores microsatelitales. A modo de ilustración, se presenta, por ejemplo, la detección de marcadores microsatelitales para la demostración del origen fetal de células aisladas según el procedimiento de la invención por amplificación por PCR de preparaciones de ADN preamplificado. La amplificación por PCR permite también detectar dianas genéticas, y especialmente mutaciones puntuales o de tipo deleciones o microdeleciones asociadas a un carácter genético o a una patología específica. Se amplifican las secuencias susceptibles de portar la deleción y se separan los productos de amplificación según su tamaño, por ejemplo por electroforesis. Se detecta la presencia de deleciones por la presencia de un producto de amplificación de tamaño inferior a los productos de amplificación que no portan la deleción.

Los productos de amplificaciones pueden secuenciarse también, en particular para caracterizar de manera precisa los marcadores o las dianas genéticas buscadas y especialmente las mutaciones o genotipos buscados con vistas a un diagnóstico prenatal. Así, en un modo de realización particular, se procede a la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida y/o al diagnóstico prenatal, especialmente a la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este, mediante la secuenciación de marcadores o dianas genéticas amplificados. A modo de ejemplo, es posible detectar mediante el procedimiento de la invención ciertas mutaciones del gen CFTR asociadas al diagnóstico de la muscoviscidosis tal como la microdeleción ΔF 508 del gen CFTR.

Es también posible diagnosticar la trisomía 21 mediante la amplificación por PCR de los marcadores de VNTR del cromosoma 21, tales como los marcadores D21S1414 y D21S1411 y la carga alélica de estos marcadores.

En otro modo de aplicación del procedimiento de la invención, se procede a la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida individualmente y después al diagnóstico prenatal, especialmente a la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este mediante hibridación de toda o parte de la preparación de ADN preamplificado con sondas de ADN específicas. Las sondas de ADN se eligen de manera que hibriden específicamente con las dianas genéticas o de polimorfismos para su identificación o con las secuencias portadoras de la diana o dianas genéticas para buscar. La hibridación de las sondas con dianas genéticas puede detectarse según las técnicas clásicas de detección de complejos de hibridación de ácidos nucleicos de tipo transferencia en ranura, transferencia Southern o, ventajosamente hoy en día, por chips de ADN o microrredes o macrorredes (14). Las sondas moleculares pueden elegirse, por ejemplo, para la detección específica de fibrosis quística, distrofias musculares, enfermedad de Gaucher, hemoglobinopatías, hemofilia, fenilcetonurias o muscoviscidosis.

Así, en un modo de realización de la invención, se fijan las sondas de ADN específicas de las dianas genéticas para identificar sobre un soporte formando un chip de ADN o microrred o macrorred. La preparación de ADN preamplificado se marca por ejemplo con la ayuda de un marcador radiactivo o fluorescente, y se pone en contacto con el chip de ADN o microrred o macrorred que consta de sondas específicas. Se mide la intensidad de hibridación para cada punto que contiene una sonda específica, determinando así con una gran sensibilidad la presencia de los marcadores buscados en el ADN de una célula recogida.

La elección de las dianas genéticas depende ciertamente del genotipo para buscar. Se describen en el estado de la técnica ejemplos de dianas genéticas utilizables según los diagnósticos prenatales.

Es un procedimiento alternativo para determinar anomalías cromosómicas y especialmente ganancias y pérdidas de cromosomas con vistas a un diagnóstico prenatal el procedimiento de hibridación genómica comparativa (CGH) consistente en (i) comparar la hibridación con una preparación cromosómica, cosmídica o con un chip de ADN de una preparación de ADN preamplificado derivada del genoma de una célula única recogida después de la filtración según el procedimiento, y de una preparación de ADN preamplificado originario de células de origen materno o de células de referencia no fetales, habiéndose marcado las dos preparaciones con la ayuda de marcadores diferentes y (ii) identificar las diferencias de hibridación entre el ADN de la célula recogida después de la filtración del ADN materno (16). Así, en un modo de realización de la invención, se procede al diagnóstico prenatal mediante un procedimiento de hibridación genómica comparativa (CGH) de una preparación de ADN preamplificado originario del

ADN de una célula única recogida y cuyo origen fetal se ha demostrado, y de una preparación de ADN preamplificado de células de origen materno o de células de referencia no fetales.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de una población de células fetales derivadas de una población de células aisladas de sangre materna y concentrada en células de origen fetal, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

a) la filtración de una muestra de sangre pura o diluida extraída de una mujer embarazada, de forma que se concentren en un filtro según su tamaño ciertas células circulantes y en particular las células de origen fetal; y
b) la puesta en cultivo de nuevo de las células retenidas en el filtro para la obtención de un cultivo de células concentradas en células fetales epiteliales.

El procedimiento descrito anteriormente es el resultado de la comprobación por los inventores de que, de forma inesperada, el procedimiento de la invención permite concentrar de manera particularmente importante una población de células aisladas de sangre materna en células de origen fetal. Es además el resultado de la comprobación de que las células pueden filtrarse incluso sin fijación anterior, es decir con la viabilidad conservada.

Además, a partir de poblaciones de células obtenidas mediante el procedimiento anterior, es posible obtener cultivos puros de células fetales según las técnicas de clonación y expansión conocidas por el especialista en la materia. Las poblaciones puras o enriquecidas en células fetales obtenidas mediante el procedimiento encuentran aplicaciones en particular en la preparación de un producto de terapia celular que comprende dichas células fetales o células originarias de su diferenciación.

El conjunto de procedimientos descritos anteriormente se basan en la existencia y elaboración de un dispositivo específico llamado ISET (acrónimo en inglés de aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales) descrito en el documento EP 0513139 y que comprende sobre una estructura:

- un filtro poroso apto para retener ciertas células circulantes según su tamaño, montado entre dos dispositivos de presión, respectivamente por delante y por detrás en el sentido de la filtración, y destinado a la hermeticidad de la filtración,
- comprendiendo el bloque por delante medios de almacenamiento y/o de pretratamiento de las muestras para analizar,
- comprendiendo el boque por detrás perforaciones enfrente de los medios de almacenamiento para recoger los desechos,
- medios de filtración forzada.

Así, la invención hace referencia a la adaptación y uso de un dispositivo de este tipo para la filtración de células fetales presentes en la sangre materna.

Se entiende por adaptación y uso:

- la incorporación al dispositivo de un filtro de porosidad, preferiblemente calibrado, apto para retener células de un diámetro medio superior a 8 µm, y mejor superior a 10 µm, preferiblemente superior a 15 µm. Se ha demostrado que un filtro de porosidad media de 8 µm responde a estas características buscadas;
- la adaptación de la densidad de poros en el filtro en función del tamaño de los poros con el fin de optimizar la capacidad de filtración,
- la adaptación de la presión aplicada sobre los medios de filtración para la conservación de la integridad física de las células fetales buscadas;
- la adaptación del medio de dilución de la muestra de sangre materna para la conservación de la integridad y viabilidad de las células buscadas.

La invención hace referencia más particularmente al uso de un dispositivo de filtración de tipo ISET para el aislamiento de células fetales de sangre materna y consiste en un filtro de porosidad media comprendida entre 6 µm y 15 µm, y preferiblemente de aproximadamente 8 µm.

Hace referencia también al uso de un dispositivo de tipo ISET en el que el filtro presenta poros de un diámetro de aproximadamente 8 µm y una densidad de poros comprendida entre $5x10^4$ y $5x10^5$.

Hace referencia finalmente al uso de un dispositivo de filtración de tipo ISET en el que la presión de filtración aplicada está comprendida entre 5 y 80 kPa, y preferiblemente aproximadamente 10 kPa.

Los ejemplos siguientes y las figuras que siguen ilustran un modo de realización del procedimiento de diagnóstico prenatal y su aplicación para la detección del sexo fetal. Demuestran además su sensibilidad y su especificidad.

Más precisamente, en el ejemplo siguiente, se aplicó el procedimiento de diagnóstico a células aisladas de sangre de 13 mujeres embarazadas. El procedimiento aplicado comprende la detección de células fetales mediante su análisis morfológico y de marcadores específicos del sexo masculino (cebadores de amplificación de secuencias del cromosoma Y). Comprende además la demostración del origen fetal de las células retenidas en el filtro por alelotipado mediante amplificación por PCR de marcadores microsatelitales. Los resultados muestran que el procedimiento de diagnóstico es particularmente sensible ya que, en madres portadoras de fetos del sexo femenino, un 100 % de las células son negativas en el ensayo del cromosoma Y. Además, el análisis de marcadores microsatelitales específicos (STR, o repeticiones cortas en tándem) de 11 células aisladas revela que 6 de ellas tienen un perfil de tipo “células fetales” y 5 tienen un perfil “materno”. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos en la detección del cromosoma Y. Constituyen la prueba molecular de que el ensayo permite, en paralelo, la detección específica de células fetales y la realización de un diagnóstico prenatal particularmente sensible y específico.

Evidentemente, este ejemplo no es limitante, y el procedimiento de la invención es aplicable al diagnóstico prenatal de cualquier característica fetal siempre que esta pueda identificarse a partir de una célula fetal epitelial aislada, individualizada y caracterizada según los medios descritos anteriormente.

LEYENDA DE LAS FIGURAS

Figura 1: gel de poliacrilamida de productos de amplificación por PCR realizada con células trofoblásticas obtenidas mediante el procedimiento de la invención. Los diferentes puntos numerados 1 a 42 representan:

Carriles 1 à 21: ensayo de especificidad de los cebadores Y mediante amplificación del ADN obtenido de 20 mujeres (carriles 1 a 12 y 14 a 21) y un hombre (carril 13, control positivo). El ensayo es negativo para las muestras de ADN de mujeres y positivo para el ADN de un hombre.

Carriles 22 a 42: ensayo de PCR de los cebadores Y con células individuales aisladas de la sangre de madre portadora de un feto de sexo masculino (carriles 23, 25, 27, 29, 31, 33, 34, 36 y 38).

El ensayo de cebadores Y es positivo para el ADN de células fetales de sexo masculino de los carriles 25, 29, 33, 36 y 38.

El ensayo de los cebadores Y es negativo para el ADN de células maternas de los carriles 23, 27, 31 y 34.

Carriles 22, 24, 26, 28, 30, 32, 35, 37 y 39: Resultado de los controles negativos correspondientes a tampón sin muestra insertado en la etapa de lisis de las células y conducido hasta el final del ensayo.

Carriles 41 y 42: Resultado de los controles positivos: una célula HuH6 (carril 40), 5 ng y 2 ng de ADN derivado de leucocitos de sangre de 3 hombres (carriles 41 y 42).

M: Marcador del peso molecular (digerido con ΦX174 HaeIII)

Figura 2: Análisis al microscopio de las características morfológicas de células fetales circulantes aisladas por ISET.

A: Células polinucleadas sincitiotrofoblásticas.

B: Células mononucleadas que presentan una morfología de citotrofoblastos, observada en un filtro. Son visibles dos poros vacíos en lo alto de la foto.

Figura 3: Genotipado con la ayuda de marcadores de STR de ADN parental y trofoblástico y de ADN de células aisladas de sangre materna y recogidas individualmente después de la filtración.

Se presentan los electroferogramas de los productos amplificados obtenidos con la ayuda de cebadores específicos del marcador de STR (repetición corta en tándem) D1653018.

A: El marcador de STR usado en este caso no permite distinguir el origen materno (M) o paterno (F) del ADN (estado heterocigótico, alelos de 250 pb y 262 pb). Sin embargo, el ADN trofoblástico (T) presenta un estado homocigótico por un alelo (250 pb) y se encuentra un perfil idéntico para una célula fetal (CF). Por el contrario, otra célula microdisecada (célula materna, CM) presenta un perfil claramente materno (estado heterocigótico).

B: En este ejemplo, el marcador de STR permite distinguir el origen paterno o materno de las células. Efectivamente, el ADN trofoblástico (T) presenta un alelo de 256 pb, encontrado también en ADN materno (M); en contraposición, el ADN paterno presenta un alelo diferente de 258 pb. Los dos alelos, de 256 y 258 pb, se han detectado en dos células microdisecadas, demostrando así su origen fetal (CF).

Ejemplo de aplicación del procedimiento de diagnóstico prenatal con células fetales aisladas de sangre materna: aplicación a la determinación del sexo del feto

Resumen del estudio

El estudio ha hecho referencia a 13 mujeres embarazadas de 11 a 12 semanas portadoras de un feto que presenta riesgo de patología genética (6 fetos de sexo masculino y 7 fetos de sexo femenino) e inscritas con su consentimiento. Se analizaron 2 ml de sangre extraída y recuperada en un tampón de EDTA. Se realizó la extracción antes de cualquier protocolo invasivo y se filtró la muestra de sangre a más tardar 4 horas después de su extracción. Se estableció el diagnóstico del sexo del feto (mediante análisis del ADN) mediante la extracción de vellosidades coriónicas.

A. Procedimientos

Se diluyeron las muestras de sangre 10 veces en un tampón de filtración que contenía 0,175 % de saponina, 0,2 % de paraformaldehído, 0,0372 % de EDTA y 0,1 % de BSA, se filtraron después con la ayuda de un filtro calibrado de policarbonato que presentaba poros calibrados cilíndricos de 8 µm de diámetro. Se agruparon las células retenidas en el filtro sobre un punto circular de 0,6 cm de diámetro. Después de coloración con eosina y hematoxilina, se analizaron los puntos al microscopio y se tomó una fotografía de cada célula a muchos y pocos aumentos. Se determinó el tamaño de las células con ayuda del software Adobe Photoshop, tomando como referencia el tamaño de 8 µm de los poros. Las fotos permiten encontrar células bajo el microscopio Pixcell II Arcturus (Mountain View, CA). La figura 2 ilustra el análisis microscópico obtenido mediante este procedimiento.

Se realizó la microdisección de cada célula mediante captura con láser sin ningún tratamiento anterior del filtro. Con el fin de asegurar que se recoge una sola célula cada vez, se tomaron fotografías del filtro antes y después de la microdisección y de la célula microdisecada depositada sobre la cápsula (CapSure™ HS). Se lisó a continuación la célula en 15 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 8, proteinasa K 400 µg/ml) durante 16 horas a 37 ºC. Se recogió el lisado después de centrifugación y se inactivó la proteinasa K a 90 ºC durante 10 minutos. Después de una preamplificación por extensión de cebadores (PEP) como se describe por Zhang *et al*. (véase anteriormente), se precipitó el ADN con etanol y se resuspendió en 10 µl de agua. Se ensayó a continuación cada muestra, por una parte con los cebadores de HAL siguientes:

5'-GTGCTGCAGGTGTAAACTTGTACCAG-3'

5'-CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTT-3',

permitiendo los cebadores de HLA ensayar la amplificabilidad del ADN (control positivo de amplificación), y por otra parte con los cebadores de STR específicos siguientes:

marcador D16S3018
(codificación) 5'-6-FAM-GGATAAACATAGAGCGACAGTTC-3' y,
(anticodificación) 5'-AGACAGAGTCCCAGGCATT-3';

marcador D16S3031
(codificación) 5'-TET-ACTTACCACTGTGCCAGTTG-3' y,
(anticodificación) 5'-ATACATGGGTCCTTAAACCG-3' ;

marcador D16S539
(codificación) 5'-HEX-GATCCCAAGCTCTTCCTCTT-3' y,
(anticodificación) 5'-ACGTTTGTGTGTGCATCTGT-3'.

Se ensayaron también las muestras con los cebadores específicos del cromosoma Y (cebadores Y: Y1.7 y Y1.9 tal como se describen en la referencia 17). Se aplicaron las PCR sobre un volumen de mezcla de reacción de 20 µl que contenía 2 µl de producto PEP, Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,01 % de gelatina, 200 mM cada desoxinucleótido, 20 picomoles de cada cebador de Y, HLA o STR y 1 U de polimerasa Taq (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA). Después de una etapa de desnaturalización inicial a 94 ºC durante 5 minutos, se procedió a 40 ciclos de amplificación (94 ºC 15 s, 60 ºC 30 s, 72 ºC 30 s) y después a una etapa final de alargamiento a 72 ºC durante 5 minutos en un termociclador Perkin Elmer 9700. Se analizaron alícuotas de 10 µl de productos de amplificación por electroforesis sobre un gel de 2 % de agarosa.

Se indican los resultados en la figura 1. Se establecieron las condiciones de PCR para la amplificación con la ayuda de cebadores específicos del cromosoma Y mediante la amplificación de 5 ng de ADN derivado de leucocitos de sangre de 3 individuos masculinos y después por amplificación del producto de ADN preamplificado de células HuH6

(derivadas de un carcinoma hepatocelular) filtradas y microdisecadas. Para la PCR con la ayuda de cebadores específicos de STR, después de una desnaturalización del ADN a 94 ºC durante 5 minutos, se procedió a 40 ciclos de amplificación (94 ºC 30 min, 54 ºC 30 min, 72 ºC 20 min) seguidos de una fase de alargamiento a 72 ºC durante 5 minutos. Se reamplificaron 2 µl del primer producto de PCR usando las mismas condiciones de PCR. Se mezcló 1 µl del producto de PCR final con 20 µl de formamida desionizada y 0,4 µl del marcador Genescan-500 TAMRA y se cargó después en un secuenciador automático ABI Prism 310. Se analizaron los perfiles usando el programa de software Genescan (Perkin Elmer, Foster City, CA). Se realizó el alelotipado por amplificación usando los mismos cebadores de STR, 1,5 ng de ADN paterno derivado de leucocitos de la sangre y/o 1,5 ng de ADN materno derivado de sangre materna o de leucocitos antes del embarazo y 1,5 ng de ADN trofoblástico de una extracción de vellosidades coriónicas.

Control de la especificidad

Se ensayó la especificidad de los cebadores de Y mediante amplificación de 10 ng de ADN derivado de leucocitos de sangre de 20 mujeres. Las precauciones usadas para evitar cualquier contaminación de los productos de PCR se han descrito anteriormente (18). Además, se intercala un control negativo (el tampón sin muestra) para cada muestra en la etapa de lisis y se analiza como las demás muestras hasta el final del ensayo. En la realización de la microdisección, se incluyó al menos una microdisección de un nuevo filtro (sin células) que se llevó en paralelo con las muestras y los controles. Se repitió la amplificación con los cebadores específicos del cromosoma Y o los cebadores específicos de STR en muestras y controles, negativos y positivos, para verificar la especificidad de los resultados positivos.

B. Resultados

Se determinó la especificidad de los cebadores de Y para la amplificación del ADN obtenido de 20 mujeres. El ensayo era negativo para las muestras de ADN de mujeres y positivo para el ADN de un hombre como control positivo, como aparece en la figura 1 cuando se comparan las líneas 1 a 12, 14 a 21 (mujeres) con la línea 13 (hombre).

Se realizó a continuación un ensayo preliminar con sangre de madre portadora de un feto de sexo masculino. Se microdisecaron las células retenidas en el filtro y se analizaron con la ayuda de cebadores específicos del cromosoma Y y de HLA definidos en la parte A. El ensayo con los cebadores de HLA era positivo para todas las células y el ensayo con los cebadores de Y era positivo para la mitad de estas células.

La figura 2 ilustra el hecho de que, en las células reveladas positivas en el ensayo, las fotografías tomadas de estas células en el filtro revelan dos tipos celulares que presentan las características morfológicas siguientes:

- células mononucleadas de tipo citotrofoblasto, de un diámetro comprendido entre 14,3 y 19,9 µm (valor medio 16,9 ± 2), un gran núcleo con cromatina condensada y poco citoplasma, a menudo con algunas microvellosidades en la superficie de las membranas,
- células polinucleadas de tipo sincitiotrofoblasto de un diámetro muy grande (generalmente alrededor de 44-47 µm).

Se analizaron a continuación 23 células de apariencia morfológica “fetal” originarias de muestras de sangre de mujer portadora de un feto de sexo masculino y 26 células procedentes de fetos de sexo femenino mediante microdisección y amplificación de secuencias del cromosoma Y. Los resultados se expresan en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Madres	Células recogidas	Células Y positivas	Células mononucleadas (positivas de Y)	Células polinucleadas (positivas de Y)
Feto masculino				
1	2	2	1 (1)	1 (1)
2	3	2	3 (2)	0
3	8	7	6 (5)	2 (2)
4	2	1	2 (1)	0
5	3	1	3 (1)	0
6	5	2	5 (2)	0
Total	23	15	20 (12)	3 (3)
Feto femenino				
7	6	0	6	0
8	3	0	1	2
9	3	0	2	1
10	2	0	1	1
11	6	0	5	1

12	3	0	3	0
13	3	0	2	1
Total	26	0	20	6
El número de células positivas de Y se indica entre paréntesis				

Esta tabla demuestra que el ensayo con cebadores de HLA era positivo para todas las células y que el ensayo con los cebadores de Y era positivo para 15 células.

Con el fin de ensayar la especificidad de estos resultados, se reamplificaron los productos de amplificación de Y con los mismos cebadores de Y. Todos los controles y células negativas de PCR daban un resultado negativo en el ensayo, mientras que las células positivas daban un resultado positivo, y una célula débilmente positiva (carril 34 de la figura 1) daba una banda más fuerte.

Globalmente, se probó la determinación de células de origen fetal para un número variable de células (de 1 a 7 células positivas de Y) aisladas de 2 ml de sangre. Sin embargo, en este estudio, el conjunto de células de apariencia morfológica “fetal” no se microdisecó. Basándose en los datos morfológicos, una primera estimación rápida lleva su número a aproximadamente 5 células por mililitro de sangre.

La segunda parte de la tabla indica los resultados del análisis de células fetales de sexo femenino. Se observa que el ensayo con la ayuda de cebadores de HLA es positivo para las 26 células analizadas procedentes de un feto de sexo femenino, mientras que el ensayo con la ayuda de cebadores específicos del cromosoma Y es negativo para el conjunto de células procedentes de un feto de sexo femenino. Estos resultados demuestran que este enfoque permite detectar específicamente células fetales sin la existencia de falsos positivos, y puede ser especialmente apropiado para identificar el sexo.

Para cuatro casos, estaban disponibles ADN de sangre paterna y/o ADN de sangre materna (obtenido antes del embarazo) y ADN trofoblástico. Estas muestras de ADN se usaron para identificar el origen fetal de las células aisladas de manera independiente de la identificación del sexo. Usando tres marcadores de STR y un quinto de la preparación de ADN preamplificado, fue así posible determinar el origen fetal o materno de 11 células microdisecadas aisladas de madre portadora de un feto de sexto masculino y ensayadas también con la ayuda de cebadores específicos del cromosoma Y. Se resumen los resultados en la tabla 2 y la figura 3.

Tabla 2:

Madre nº*	Célula única recogida	PCR específica de Y	Genotipado de una célula única recogida		
			Marcador D16S539	Marcador D16S3018	Marcador D16S3031
2	2a	+	CF		
	2b	+	CF		
3	3a	+		CF	
	3b	+		CF	
	3c	-			CM
	3d	+			CF
4	4a	-		CM	
	4b	+		CF	
6	6a	-			CM
	6b	-			CM
	6c	-			CM
*: véase la tabla 1; CM: célula materna; CF: perfil de célula fetal					

Genotipado de STR de células únicas aisladas de sangre materna y recogidas individualmente después de la filtración

6 células presentan un perfil fetal de acuerdo con la detección positiva del cromosoma Y y 5 células presentan un perfil materno de acuerdo con la detección negativa del cromosoma Y.

En un caso (figura 3A), los marcadores de STR ensayados no permiten distinguir los alelos paternos (F) de los alelos maternos (M) (heterocigótico, 250 y 262 pb), sin embargo, el ADN trofoblástico (T) presenta un estado homocigótico para uno de los alelos (250 pb). Se detectó el mismo perfil (homocigótico para el alelo de 250 pb) en una célula fetal (CF) aislada según el procedimiento de la invención, siendo dicha célula positiva en el ensayo de detección del cromosoma Y. Por el contrario, otra célula microdisecada, negativa en el ensayo de detección del cromosoma Y, presenta un perfil claramente heterocigótico (célula materna, CM).

En otro caso (figura 3B), el ADN trofoblástico (T) presenta, además del alelo materno (256 pb) también detectado a partir del ADN materno (M), un alelo paterno (258 pb). Estos dos alelos se han encontrado en las dos células microdisecadas (CF), determinando así su origen fetal.

Discusión

Este estudio muestra por primera vez que es posible concentrar mediante filtración las células fetales circulantes en la sangre materna. Muestra además que puede realizarse la identificación de las células fetales, independientemente de la identificación del sexo genético, mediante la amplificación por PCR de marcadores de STR altamente polimórficos. El impacto clínico del procedimiento de detección de marcadores de STR depende de hecho de la posibilidad de combinar este procedimiento con un enfoque particularmente eficaz de enriquecimiento en células fetales. Este estudio muestra por primera vez que es posible combinar con éxito los dos enfoques. La técnica de separación por tamaño se ha descrito ya para la separación de células tumorales circulantes en la sangre (Vona *et al.,* véase anteriormente). Los inventores han mostrado ahora que era posible concentrar y analizar genéticamente las células fetales recogidas después de su concentración a partir de solo 2 ml de una muestra de sangre materna. En combinación con la microdisección láser y la PCR en célula individual usando cebadores específicos del cromosoma Y o cebadores de STR, este enfoque ha permitido la demostración del origen fetal de las células recogidas. Teniendo en cuenta el número de células fetales circulantes en la sangre estimado en una célula por ml de sangre, o sea una célula fetal por 10 millones de leucocitos, el enriquecimiento obtenido es de un factor de aproximadamente 6,6 millones (una célula fetal por 1,5 células grandes retenidas en el filtro). Además, este enfoque permite obtener informaciones morfológicas sobre las células fetales circulantes en la sangre. Se aislaron células mononucleadas que son probablemente células de tipo citotrofoblasto y células polinucleadas que son células sincitiotrofoblásticas. Estos dos tipos de células no se habían observado nunca en 22 donantes de sangre sanos y 44 pacientes con carcinoma analizados según la misma técnica de separación y microdisección (resultados no presentados).

Además, los progenitores linfoides o mieloides fetales persisten en la circulación sanguínea después del embarazo, pero no las células trofoblásticas. La ventaja del análisis de las células trofoblásticas es por tanto también que permite asociar el resultado del ensayo genético de forma segura con el embarazo en curso.

Otra ventaja de este enfoque es la posibilidad de realizar al menos 5 análisis de PCR a partir del ADN de una sola célula individual. Esto da la posibilidad de realizar un ensayo genético en las células cuyo origen fetal se habría probado en paralelo por análisis molecular, en particular por análisis de marcadores polimórficos de STR. Es también posible basar el diagnóstico en el cotejo de resultados independientes obtenidos en diferentes células fetales individuales aisladas de extracciones repetidas de muestra de sangre. De forma interesante, se observará que el protocolo FISH puede aplicarse también con éxito a células aisladas según el procedimiento de filtración (9). Las demás ventajas del procedimiento según la invención radican, por una parte, en su sensibilidad ya que casi un 100 % de las células fetales recogidas basándose en su observación morfológica y analizadas se identifican como tales por el procedimiento de la invención y, por otra parte, en su especificidad, ya que en particular las células apoptóticas fetales y las células de origen materno pueden sustraerse del análisis en vista de sus características genéticas y morfológicas.

El procedimiento de la invención propone por tanto un nuevo enfoque para la realización de un diagnóstico prenatal precoz no invasivo y particularmente sensible y específico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bianchi D. “Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis”. Br. J. Haematol. 1999 105: 574-583
2. Fisk N. “Maternal-fetal medicine and prenatal diagnosis”. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 1998 10: 81-83
3. Di Naro E, Ghezzi F, Vitucci A, *et al.* “Prenatal diagnosis of β-thalassemia using fetal erythroblasts enriched from maternal blood by a novel gradient”. Mol. Hum. Reprod. 2000 6: 571-574
4. Watanabe A, Sekizawa A, Taguchi A, *et al.* “Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency by using a single nucleated erythrocyte from maternal blood”. Hum. Genet. 1998 102: 611-615
5. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T. “Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood”. Prenat. Diagn. 1995 15: 74-77
6. Sekizawa A, Taguchi A, Watanabe A, *et al*. “Analysis of HLA-DQ alpha sequences for prenatal diagnosis in single fetal cells from maternal blood”. Hum. Genet. 1998 102: 393-396
7. Bianchi DW. “Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation”. J. Perinat. Med. 1998 26: 175-85
8. Bianchi DW *et al.*, PNAS 1996, 93: 705
9. Vona G, Sabile A, Louha M, *et al.* “Isolation by Size of Epithelial Tumor cells. A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells”. Am. J. Pathol. 2000 156: 57-63.
10. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. “Presence of fetal RNA in maternal plasma [citación en proceso]. Clin. Chem. 2000; 46(11): 1832-4.
11. Lohse J., Dahl O., Nielsen, PE. PNAS 1999 96: 11804-11808. “Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeing of double-stranded DNA.

12. Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Missasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. y Weissenbach, J. “A comprehensive genetic map of the human genome based on 5.264 microsatelites”. Nature 1996 380: 152-154.
13. Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R.WN., Arnheim, M. “Whole genomic amplification from a single cell: implications for genetic analysis”. PNAS 1992 89: 5847-5851.
14. Sambrook *et al.* “Molecular Cloning: A laboratory Manual”. 2001 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nuevaw York
15. “Diagnostics prénatals et biologie moléculaire”, F. Forestier y DF Schroderet, 1997 Ed. Tec et Doc Lavoisier.
16. Voullaire L, Wilton L, Slater H y Williamson R. Prenat. Diagn. 1999 19: 846-851
17. Lo YM, Patel P; Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA, Wainscoat JS. “Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood [carta]. Lancet 1990; 335: 1463-4.
18. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, *et al.* “Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen”. N. Engl. J. Med. 1009; 323: 80-85.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico prenatal en células fetales aisladas de sangre materna que comprende las etapas siguientes:

a) la filtración de una muestra de sangre materna pura o diluida en un filtro de porosidad comprendida entre 6 y 15 µm, de forma que se concentren en el filtro según su tamaño ciertas células circulantes, y en particular células de origen fetal que tengan un tamaño comprendido entre 14 y 17 µm;
b) el análisis y la caracterización de las células retenidas aisladas en el filtro para la búsqueda de la presencia de un marcador o marcadores inmunológicos y/o citológicos y/o genéticos, con el fin de identificar su naturaleza epitelial y obtener una presunción de su origen fetal o materno; y la recogida individual de la célula o células epiteliales cuyo origen fetal se supone;
c) la demostración, mediante análisis genético, del origen fetal de una célula o células de origen fetal supuesto recogidas individualmente en la etapa b; y
d) la búsqueda de anomalías genéticas en el genoma o genomas de células cuyo origen fetal se ha demostrado en la etapa c).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se procede a la identificación del origen fetal o materno de las células de la etapa (c) mediante la búsqueda de un marcador o marcadores genéticos característicos de las células fetales.

3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la presión de filtración aplicada en dicha etapa a está comprendida entre 5 kPa y 80 kPa, y preferiblemente 10 kPa.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque las células retenidas en el filtro se recogen individualmente por microdisección.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la microdisección consiste en cortar con láser la parte de la membrana filtrante sobre la que se retiene una célula o despegar la célula con la ayuda del láser y recuperar después la célula única recogida en un tubo apropiado.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la etapa (d) se realiza en el genoma de una célula única recogida.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el análisis genético en el genoma de una célula única recogida permite (i) la demostración del origen fetal o materno de dicha célula y (ii) la búsqueda de anomalías genéticas o cromosómicas del feto o de un genotipo particular de este si se demuestra el origen fetal de dicha célula.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida se realiza mediante la identificación en una preparación de ADN derivado del genoma de la célula única recogida de uno o varios marcadores genéticos o de polimorfismo, de una combinación de estos marcadores o de una carga alélica particular de estos marcadores, demostrando la contribución biparental al ADN fetal.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este se realiza mediante la identificación de una diana genética en una preparación de ADN derivada del genoma de la célula única recogida.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque, anteriormente a la demostración del origen fetal o materno de una célula única recogida y/o a la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este, se lisa dicha célula recogida y se preamplifica el conjunto de su genoma y se purifica de manera que se obtenga una preparación de ADN preamplificado derivada del genoma de una célula única recogida.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se procede a la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida, y después a la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este, mediante la amplificación de marcadores genéticos o de polimorfismo o de una combinación de estos marcadores o de una o varias secuencias portadoras de la diana o dianas genéticas buscadas, a partir de la preparación de ADN preamplificado derivada del genoma de dicha célula.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque la amplificación de al menos un marcador genético o de polimorfismo o de al menos una secuencia portadora de una diana genética se realiza a partir de menos de un quinto de la preparación de ADN preamplificado.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 o 12, caracterizado porque se procede a la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida y/o a la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este mediante la secuenciación de los marcadores o dianas genéticas amplificados.

14. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se procede a la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida y/o a la búsqueda de una anomalía genética o cromosómica del feto o de un genotipo particular de este mediante la hibridación de toda o parte de la preparación de ADN preamplificado con sondas de ADN específicas o de tipo PNA (ácido péptidonucleico).

15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque se fijan las sondas de ADN específicas sobre un soporte formando un chip de ADN o microrred o macrorred.

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, caracterizado porque al menos un marcador de polimorfismo para identificar es un marcador microsatelital, un marcador de VNTR (número variable de repeticiones en tándem), un marcador de SNP (polimorfismo de nucleótido simple) o un marcador de STR (repeticiones cortas en tándem).

17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, caracterizado porque se procede a la demostración del origen fetal o materno de una célula recogida mediante la búsqueda de un marcador o de una combinación de marcadores o de una carga alélica de estos marcadores que se distingan de los detectados en el genoma de células no maternas, en particular mediante la búsqueda en el genoma de dicha célula recogida de un marcador o de una combinación de marcadores específica del ADN de células paternas.

18. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se procede a la búsqueda de una anomalía cromosómica mediante un procedimiento de hibridación genómica comparativa (CGH) de una preparación de ADN preamplificado derivada del genoma de una célula única recogida y cuyo origen fetal se demuestra, y de una preparación de ADN preamplificado de células de origen materno o de células de referencia no fetales.

19. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se procede al diagnóstico prenatal de una anomalía cromosómica o del sexo del feto mediante la hibridación *in situ* de una sonda específica de la anomalía cromosómica o del sexo para detectar en el genoma de células retenidas en el filtro.

20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque la muestra de sangre materna filtrada es originaria de una extracción de sangre efectuada después de la 5ª semana de embarazo.

21. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque el análisis genético de las células retenidas en el filtro se realiza a partir de la filtración de 1 a 10 ml de sangre materna extraída.

22. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la muestra de sangre materna extraída se diluye de 10 a 100 veces en una solución de filtración.

23. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se procede a la filtración de la muestra de sangre materna pura o diluida con la ayuda de un filtro cuyos poros tienen un diámetro de aproximadamente 8 µm.

24. Procedimiento según la reivindicación 23, caracterizado porque el filtro presenta poros de un diámetro de aproximadamente 8 µm y una densidad de poros comprendida entre $5x10^4$ y $5x10^5$ poros/cm^2.

25. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque el filtro es una membrana filtrante de policarbonato cuyo tamaño de poros está calibrado.

26. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, caracterizado porque dicha búsqueda de la presencia de un marcador o marcadores inmunológicos comprende un inmunomarcaje con la ayuda de un anticuerpo anticitoqueratinas.

27. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, caracterizado porque dicha búsqueda de la presencia de un marcador o marcadores inmunológicos comprende la búsqueda de la presencia de antígenos asociados a células trofoblásticas.

28. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, caracterizado porque dicha búsqueda de la presencia de un marcador o marcadores citológicos comprende la búsqueda de la presencia de marcadores citológicos específicos de células citotrofoblásticas y/o sincitiotrofoblásticas.

29. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, caracterizado porque dicha sangre materna es la sangre de una mujer embarazada entre la 5ª y la 15ª semanas de embarazo.

30. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, caracterizado porque, antes de dicha etapa de filtración, se diluye dicha muestra de sangre materna en una solución de filtración consistente en un reactivo de fijación de células nucleadas y/o de lisis de glóbulos rojos.

31. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, caracterizado porque las células retenidas en el filtro se vuelven a poner en cultivo para la obtención de un cultivo de células concentradas en células fetales.

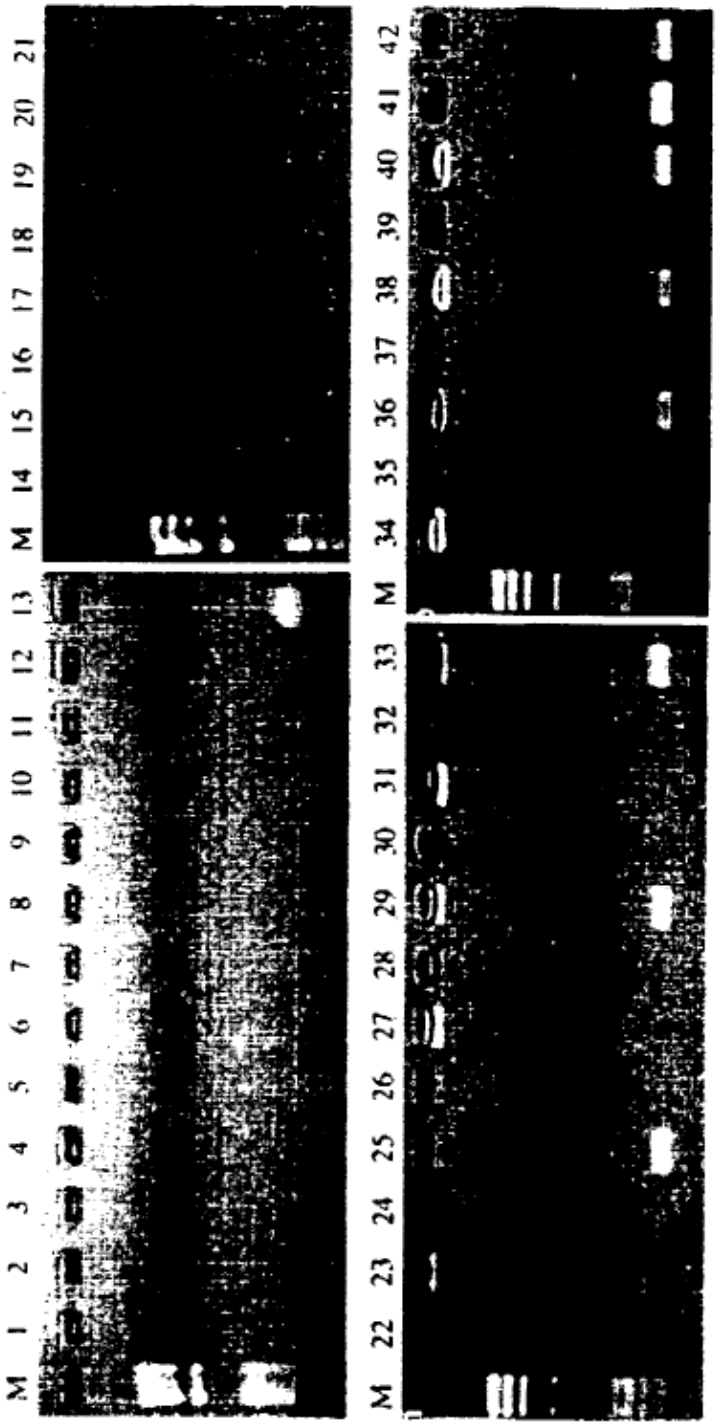

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
M 14 15 16 17 18 19 20 21
M 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
M 34 35 36 37 38 39 40 41 42

Figura 1

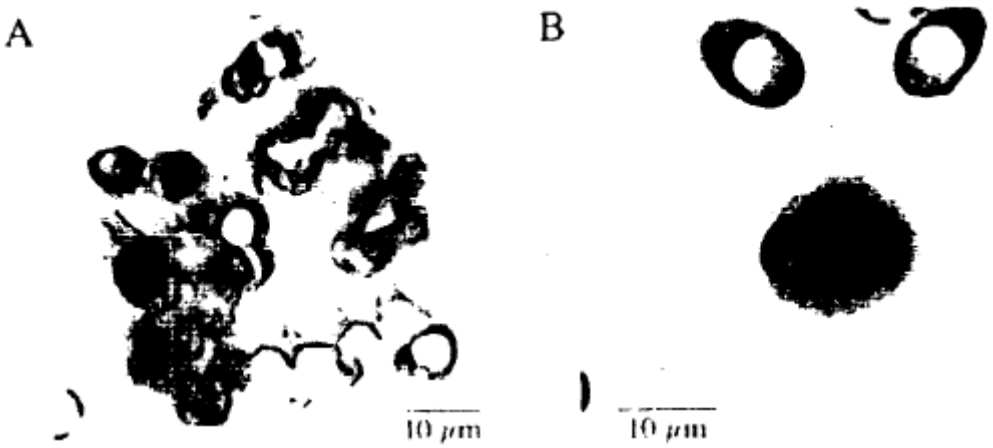
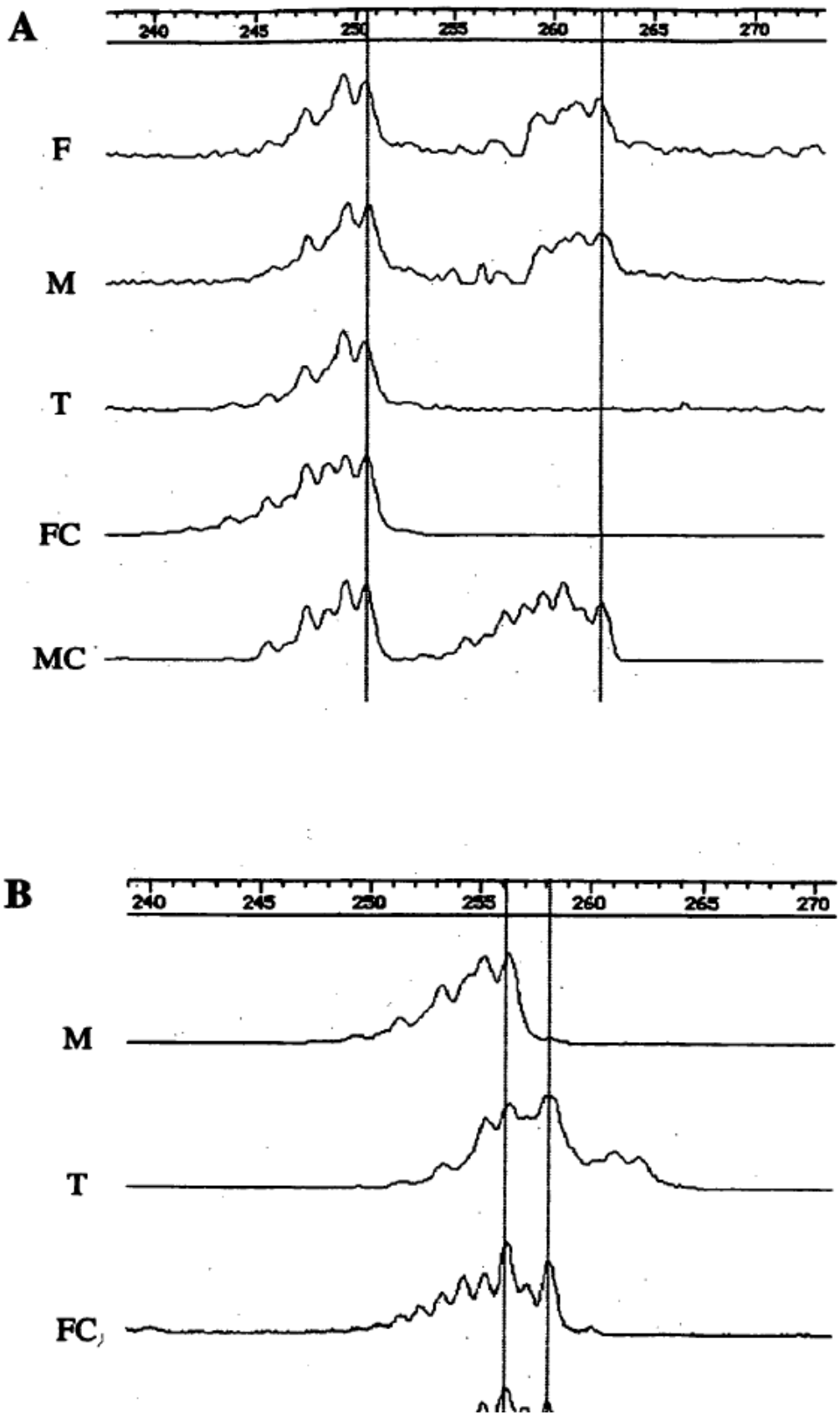


Figura 2


A
240
245
250
255
260
265
270
F
M
T
FC
MC
B
240
245
250
255
260
265
270
M
T
FC