

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 384**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11804760 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2655655**

54 Título: **Detección de diferencias genéticas cuantitativas**

30 Prioridad:

20.12.2010 GB 201021499

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

26.07.2016

73 Titular/es:

**PREMAITHA LIMITED (100.0%)
Rutherford House, Manchester Science Park
M15 6SZ Manchester, GB**

72 Inventor/es:

**OLD, ROBERT;
CREA, FRANCESCO y
ROBERTS, CHARLES**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 578 384 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

Detección de diferencias genéticas cuantitativas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los usos y métodos para la detección de una diferencia cuantitativa entre una primera y segunda regiones de secuencias objetivo presentes en una muestra de ácido nucleico, en particular, pero no exclusivamente, una muestra de ADN, y a un kit para llevar a cabo los usos y métodos de la invención.

Antecedentes de la invención

10 La detección de pequeñas diferencias en el contenido de ácido nucleico puede ser muy importante en la detección y el diagnóstico de una enfermedad o una predisposición a una enfermedad. Las diferencias pueden ser diferencias en la dosis de un gen o en el número de un cromosoma. Sin embargo, la detección de pequeñas diferencias es muy difícil.

15 Las diferencias en la dosis de un gen en las células somáticas se ejemplifican mediante las anomalías cromosómicas que dan como resultado la ganancia o pérdida de material genético, observadas a menudo en los tumores malignos. Entre estas anomalías, la amplificación de oncogenes (incremento del número de copias de un gen) se considera uno de los mecanismos más importantes de activación de oncogenes en la carcinogénesis. La detección eficaz de genes amplificados puede ser útil en el diagnóstico, y parece ser especialmente importante para predecir la sensibilidad a la quimioterapia en varios tumores malignos. La selección correcta de las estrategias de tratamiento en casos individuales puede mejorar significativamente la esperanza de vida en los pacientes con tumores avanzados. El papel de la amplificación del gen HER2/neu (c-erbB-2) en la determinación de la sensibilidad del cáncer de mama a la quimioterapia puede ser un buen ejemplo.

20 Sin embargo, en muchos casos es difícil detectar de manera fiable la amplificación de un gen en tumores, ya que las muestras de tejido o células tumorales obtenidas de los pacientes normalmente se caracterizan por una presencia intensa de elementos celulares no malignos que representan el tejido conectivo, la sangre y las células linfoides, células inflamatorias, etc. Por esta razón, el análisis de la amplificación de un gen en este material requiere una sensibilidad elevada para permitir la detección de la presencia de copias extra de el/los gen(es) objetivo en las muestras mezcladas de células malignas y normales proporcionadas por la extracción quirúrgica de tumores, biopsias, toma de muestras de líquidos corporales, etc.

25 Se sabe que las anomalías cromosómicas numéricas hereditarias, es decir, un incremento o una disminución del número de un cromosoma particular, provocan varios síndromes, que pueden conducir a discapacidad física o mental en la vida (síndromes de Down, Klinefelter, Edwards, Patau, XXX, XXY etc.). Por lo tanto, es deseable detectar si un niño en etapa prenatal, en particular un feto, tiene tal anomalía. Conocer la probabilidad de la enfermedad puede proporcionar una información útil a los padres, que pueden desear interrumpir el embarazo o prepararse para cuidar de un niño discapacitado.

30 Aunque el ADN fetal libre de células (ADN flic) se usa de manera rutinaria para determinar el sexo fetal, para el análisis del estado Rhesus D, y para el diagnóstico de trastornos genéticos poco frecuentes, p.ej. β -talasemia, nadie ha sido capaz de aplicar esta tecnología al diagnóstico de afecciones genéticas más habituales, debido al gran fondo de ADN libre de células materno. Algunos grupos están intentando usar SNPs junto con ARN flic específico fetal o marcadores epigenéticos específicos fetales, p.ej. la metilación, para seleccionar el ADN flic específico fetal. Sin embargo, los SNPs se pueden usar solamente para analizar fetos que son heterocigotos para el SNP objetivo, y así se limita el porcentaje de la población que se puede ensayar. Además, los marcadores epigenéticos están influidos por la exposición de la madre a factores ambientales, que en principio podrían influir en el estado epigenético del feto.

35 Los ensayos convencionales para las anomalías cromosómicas de fetos son invasivos, ya que requieren que un profesional médico obtenga el material celular directamente del feto o del líquido amniótico que rodea al feto. Tales procedimientos invasivos pueden conducir a complicaciones o incluso a la interrupción del embarazo.

40 Es deseable proporcionar un ensayo para una anomalía cromosómica numérica fetal y/o para diferencias en la dosis de genes que no sea invasiva, por ejemplo, ensayando una muestra de sangre materna, que tendrá ácido nucleico fetal en ella. Se puede hallar ADN fetal en el plasma sanguíneo materno desde el principio del embarazo, y su transición transplacentaria parece incrementarse en los casos de anomalías cromosómicas fetales. Sin embargo, puede ser difícil detectar un desequilibrio en el número de copias de un cromosoma y/o de un gen mediante el uso de la sangre materna, ya que es probable que el número de copias incrementado o disminuido del gen o del cromosoma objetivo observado en el ADN fetal anormal esté enmascarado por la presencia del ADN materno normal en exceso. La PCR en tiempo real cuantitativa convencional no es lo suficientemente sensible como para detectar la pequeña diferencia en el número de copias de un gen o de un cromosoma, ya que solamente una pequeña fracción del ADN molde es del feto.

45 La anomalía cromosómica numérica más habitual conocida como síndrome de Down está provocada por un

desequilibrio del número de copias de un cromosoma, en el que un paciente tiene una copia adicional del cromosoma 21 (trisomía 21). Una muestra de ADN fetal puro de un sujeto afectado de síndrome de Down tendría una proporción 3:2 del cromosoma 21 respecto de otro cromosoma, tal como el cromosoma 1. Mientras, en una muestra de sangre materna que comprende una mezcla de ADN materno y fetal trisómico, la proporción del cromosoma 21 respecto de otro cromosoma sería mucho menor que $(2+x):2$ (en la que x es una fracción de 1 que corresponde a la porción de ADN fetal trisómico en la muestra), debido a que la cantidad relativamente grande de ADN materno domina en el contenido de ADN total de la muestra de sangre materna. Por ejemplo, si el ADN fetal proporcionase el 15% del ADN en una muestra de sangre materna de una madre con un feto afectado de síndrome de Down, esto daría una proporción de cromosoma 21 respecto de cualquier otro cromosoma de 2,15:2. Esta proporción está muy por debajo del límite de detección de la PCR en tiempo real convencional. Así, son necesarios métodos mejorados de detección del ADN para observar estas diferencias.

El documento WO2009/127408 describe un método para la determinación cuantitativa del número de al menos una secuencia predeterminada en una muestra biológica, en particular un método para la determinación del número absoluto de copias de alelos por célula. Singer *et al* (2010) Nano Lett. 10, 738-742 describe un método de detección basado en nanoporos para detectar secuencias de ADN específicas mediante hibridación de ADN bicatenario con sondas de ácido peptidonucleico (APN).

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para la detección de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de una primera región objetivo de un ácido nucleico y una segunda región objetivo de un ácido nucleico en una muestra, de forma que la primera región objetivo es un gen o cromosoma cuyo número de copias relativo se va a estudiar, y la segunda región objetivo es un gen o cromosoma diferente presente en un número de copias normal, en el que dicho método comprende las etapas de:

- (a) proporcionar la muestra que comprende el ácido nucleico;
- (b) hibridar una o más primeras sondas a la primera región objetivo;
- (c) hibridar una o más segundas sondas a la segunda región objetivo, de forma que el número y/o la posición de las segundas sondas en la segunda región objetivo difiere del número y/o la posición de las primeras sondas en la primera región objetivo;
- (d) detectar el número y/o la posición de las primeras sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la primera región objetivo;
- (e) detectar el número y/o la posición de las segundas sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la segunda región objetivo;

en el que una diferencia entre el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (d) y el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (e) es indicativa de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de la primera y la segunda regiones objetivo de un ácido nucleico en la muestra; y

en el que las etapas de detección (d) y (e) comprenden un método de detección basado en nanoporos.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para la detección de una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma en una muestra, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar la muestra que comprende el ácido nucleico;
- (b) hibridar una o más primeras sondas a la primera región objetivo;
- (c) hibridar una o más segundas sondas a la segunda región objetivo, de forma que la primera región objetivo es un gen o cromosoma cuyo número de copias relativo se va a estudiar, y la segunda región objetivo es un gen o cromosoma diferente presente en un número de copias normal, y de forma que el número y/o la posición de las segundas sondas en la segunda región objetivo difiere del número y/o la posición de las primeras sondas en la primera región objetivo;
- (d) detectar el número y/o la posición de las primeras sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico específicas de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la primera región objetivo;
- (e) detectar el número y/o la posición de las segundas sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico específicas de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la segunda región objetivo;

en el que una diferencia entre el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (d) y el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (e) es indicativa de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de la

primera y la segunda regiones objetivo de un ácido nucleico en la muestra, y en el que la detección de una diferencia cuantitativa es indicativa de una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma; y

en el que las etapas de detección (d) y (e) comprenden un método de detección basado en nanoporos.

- 5 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un método como se define en la presente memoria para determinar si un individuo tiene un incremento o una disminución en el número de copias de un gen o de un cromosoma.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 describe una representación esquemática del primer aspecto de la invención.

Las Figuras 2-5 describen una representación gráfica de una realización del método de la invención.

10 Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describe el uso de un complejo de nanoporos para analizar una molécula individual que comprende al menos un nanoporo en la detección de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de una primera región objetivo de ácido nucleico y una segunda región objetivo de ácido nucleico en una muestra.

- 15 El uso de complejos de nanoporos en la secuenciación del ADN se ha demostrado haciendo pasar una molécula de ADN monocatenaria (ssADN) individual a través de un poro de la proteína α -hemolisina (α HL) estafilocócica bajo un potencial aplicado mientras se registraban las modulaciones de la corriente iónica que pasaba a través del poro (Clarke, J. *et al* (2009) *Nature Nanotechnology* 4, 265-270). Cada base se registra en secuencia por una disminución característica de la amplitud de la corriente. Por lo tanto, el método de secuenciación con nanoporos tiene la capacidad de realizar un recuento individual de moléculas individuales en el ácido nucleico. Sin embargo, el uso de la tecnología de nanoporos se ha limitado únicamente a la identificación de residuos de nucleótidos específicos, principalmente con el propósito de secuenciación, y no se ha aplicado a la detección de diferencias cuantitativas entre muestras determinadas de ácido nucleico. La invención se dirige, por lo tanto, al uso de la tecnología de nanoporos para llevar a cabo el recuento de moléculas individuales en muestras determinadas de ácido nucleico para detectar diferencias cuantitativas entre las muestras. La invención, por lo tanto, tiene una utilidad particular y sorprendente en el diagnóstico prenatal de un desequilibrio o anomalía en un cromosoma fetal.

- 25 Las referencias en la presente memoria a la expresión "complejo de nanoporos" se refieren a una estructura que comprende (a) un primer y un segundo compartimento separados por una barrera física, cuya barrera tiene al menos un poro con un diámetro, por ejemplo, de alrededor de 1 a 10 nm, y (b) un medio para aplicar un campo eléctrico a través de la barrera, de forma que una molécula cargada, tal como un ADN o ARN opcionalmente hibridado con APN o bis-APN, puede pasar desde el primer compartimento a través del poro hasta el segundo compartimento. El nanoporo comprende además de manera ideal un medio para medir el distintivo electrónico de una molécula que pasa a través de su barrera. La barrera del nanoporo puede ser sintética o natural en parte. Las barreras pueden incluir, por ejemplo, bicapas lipídicas que tienen α -hemolisina en ellas, canales de proteínas oligoméricas tales como porinas, y péptidos sintéticos y similares. Las barreras también pueden incluir placas inorgánicas que tienen uno o más orificios de un tamaño adecuado.

Se apreciará que en la realización en la que hay más de un nanoporo, el análisis del ácido nucleico objetivo se dará mediante análisis paralelos en los más de un nanoporo.

En una realización, la primera región objetivo es un gen o cromosoma cuyo número de copias relativo se va a estudiar, y la segunda región objetivo es un gen o cromosoma diferente presente en un número de copias normal.

- 40 Se apreciará que la expresión "diferencia cuantitativa" usada en la presente memoria se refiere a una diferencia en el número de copias de un gen, operón, cromosoma, parte de un cromosoma, o una secuencia de ácido nucleico, tal como un producto de amplificación. La expresión "detección cuantitativa" usada en la presente memoria se refiere a la detección de la diferencia en el número de copias de un gen, operón, cromosoma, parte de un cromosoma, o una secuencia de ácido nucleico, tal como un producto de amplificación.
- 45 En una realización, la detección proporciona el diagnóstico prenatal de un desequilibrio o anomalía de un cromosoma fetal. Los usos (y métodos) de la invención tienen la ventaja de que se puede usar un procedimiento no invasivo para el diagnóstico de una anomalía de un gen o de un cromosoma en un feto mediante el uso, por ejemplo, de una muestra de sangre materna. Así, llevar a cabo el método de la invención no incrementa el riesgo de interrupción de un embarazo.
- 50 En una realización, la etapa de detección comprende un método de detección con nanoporos que se puede llevar a cabo de acuerdo con la metodología descrita en Singer *et al* (2010) *Nano Lett.* 10, 738-742. En una realización, la etapa de detección comprende el uso de un detector que comprende un único nanoporo de un diámetro menor de 10 nm, tal como un diámetro menor de 5 nm (en particular un diámetro de aproximadamente 4 a 5 nm). Tal intervalo de diámetros es ventajoso, porque permite la entrada de ADN sin plegar y un transporte más lento que los poros

mayores, lo que proporciona una detección más exacta del paso de las sondas. El nanoporo propiamente dicho está fabricado de una membrana de nitruro de silicio (SiN) independiente mediante el uso de un haz de electrones enfocado. El chip detector se puede construir entre dos cámaras de fluido en miniatura (denominadas cis y trans) que se hidratan mediante el uso de una disolución de KCl 1 M tamponada. Después se aplica una polarización positiva a través de la membrana de SiN mediante el uso de un par de electrodos de Ag/AgCl. Las moléculas de ADN cargadas negativamente se capturan y pasan linealmente a través del nanoporo desde la cámara cis a la trans. Durante el proceso de paso, la corriente de iones se reduce transitoriamente hasta un valor que refleja una primera aproximación del desplazamiento de electrolitos desde el nanoporo por el segmento de ADN en el poro. El método de detección con nanoporos, que tiene una utilidad excelente en el uso y los métodos de la invención, permite la identificación de alto rendimiento (>1 molécula/segundo a concentraciones de ADN sub nM) de secuencias de ácido nucleico específicas mediante el uso de sondas hibridadas.

En una realización, la etapa de detección comprende la metodología descrita en el documento WO 2010/004265, que está relacionado con el método de detección con nanoporos descrito en la presente memoria con la unión covalente adicional de una subunidad de poro de proteína transmembrana a una enzima de manipulación de ácido nucleico, que da como resultado una construcción que es capaz de formar un poro y manipular los ácidos nucleicos. La naturaleza fija y en estrecha proximidad de la enzima al poro da como resultado que una proporción de los nucleótidos de un ácido nucleico objetivo interaccionen con el poro y afecten a la corriente que fluye a través del poro de una manera característica para crear el distintivo específico requerido por la invención para diferenciar una primera región objetivo de una segunda región objetivo.

En una realización, la etapa de detección comprende la metodología descrita en el documento WO 2007/041621, que usa un nanoporo de una manera que permite la detección de las posiciones (relativas y/o absolutas) de las sondas de ácido nucleico que hibridan con una molécula de ácido nucleico monocatenario de interés. A medida que la cadena de interés y las sondas hibridadas se translocan a través del nanoporo, las fluctuaciones de corriente medidas a través del nanoporo variarán en función del tiempo. Estas fluctuaciones de corriente se usan después para determinar las posiciones de unión de las sondas a lo largo de la cadena de interés.

En una realización, la etapa de detección comprende la metodología descrita en el documento WO 2010/080617, que emplea membranas que tienen un nanoporo con un campo eléctrico enfocado y localizado a través del cual se puede translocar una molécula de ADN desde un compartimento adyacente a una superficie de la membrana, a través del poro de la membrana, y por la superficie opuesta de la membrana adyacente a un segundo compartimento, para facilitar el análisis, la clasificación y la detección del ADN.

En una realización, la etapa de detección comprende la metodología descrita en el documento WO 2009/155423, que comprende una cámara de analito larga, estrecha, que tiene un nanoporo o un pequeño número de nanoporos formados en ella en una región de interacción. De manera más específica, la cámara de analito tiene una longitud de aproximadamente 100 veces la anchura y altura de la cámara, con la región de interacción localizada a una distancia específica del segundo electrodo. Una muestra, que incluye un analito de interés, se introduce en la cámara de analito a través de un orificio de acceso. Los primeros y segundos electrodos están colocados a cada lado de la región de interacción, y proporcionan un campo eléctrico a lo largo de la longitud de la cámara de analito. Este campo provoca una fuerza electroforética que impulsa a las moléculas objetivo o analitos de interés hacia el nanoporo para incrementar el número de moléculas objetivo cerca del nanoporo (es decir, la región de interacción) y, de ese modo, incrementar el número de moléculas por unidad de tiempo que interaccionan con el nanoporo. El analito de interés se puede medir o analizar después mediante la utilización de las señales de bloqueo del poro detectadas mediante un sensor de corriente.

En una realización, la etapa de detección comprende la metodología descrita en el documento US 2009/298072, que se refiere de manera específica a la comparación de un distintivo determinado obtenido haciendo pasar ADN a través de un poro de diámetro adecuado aplicando un campo eléctrico al ADN con otro distintivo determinado para establecer la identidad de tal molécula de ADN.

En una realización, la etapa de detección comprende la metodología descrita en el documento WO 2009/007743, que usa registros de nanoporos para detectar moléculas de ácido nucleico. Cuando se añaden a un depósito, las cadenas de ácido nucleico se impulsan de manera electroforética a través del poro. El bloqueo temporal del poro conduce a una reducción reversible de la corriente que fluye a través del poro. Dado que la corriente está fluyendo a través de un único canal, los registros del nanoporo son capaces de detectar cadenas individuales de ácido nucleico.

En una realización, la etapa de detección comprende la metodología descrita en Clarke, J. *et al* (2009) Nature Nanotechnology 4, 265-270, que además comprende una molécula adaptadora unida de manera covalente para identificar continuamente moléculas de 5'-monofosfato de nucleósido sin marcar con exactitudes de una media del 99,8%.

Los ejemplos adecuados de ácido nucleico incluidos pueden ser ADN o ARN, en particular ADN. Cuando el ácido nucleico comprende ADN, el ADN puede ser monocatenario o bicatenario. El ácido nucleico puede ser una mezcla de ácido nucleico de tejido maligno y normal/no maligno. El ácido nucleico puede ser una mezcla de ácido nucleico de tejido maligno y normal/no maligno presente en una biopsia o muestra de líquido corporal. El ácido nucleico

puede ser una mezcla de ácido nucleico materno y fetal. El ácido nucleico puede ser una mezcla de ácido nucleico materno y fetal hallado en una muestra de sangre materna.

5 La muestra puede ser una muestra de tejido, tal como una biopsia o explante de tejido. La muestra puede comprender sangre. La muestra, en una realización, puede comprender sangre materna. La muestra puede comprender un líquido corporal. La muestra puede comprender plasma o suero sanguíneo. La muestra puede ser plasma sanguíneo materno, que comprende ácido nucleico fetal. La muestra puede comprender ácido nucleico materno y fetal. La muestra se puede recoger mediante un procedimiento no invasivo con respecto al feto y/o al saco amniótico. La muestra se puede recoger de manera intravenosa de una mujer embarazada.

10 La muestra se puede obtener del líquido amniótico que rodea a un feto o embrión *in utero*, o directamente del feto o del embrión *in utero*. La muestra se puede obtener de un sujeto mamífero, preferiblemente la muestra es de un ser humano.

15 Aunque es sumamente eficaz, se apreciará que el análisis de moléculas individuales de los métodos de detección con nanoporos conocidos generará una gran cantidad de datos que requerirán un análisis y diagnóstico por parte de bioinformáticos. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un método fiable y eficaz para detectar diferencias cuantitativas entre muestras de ácido nucleico que sea más simple, barato y sin la carga de analizar grandes cantidades de datos.

20 Así, según un aspecto de la invención, se proporciona un método para la detección de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de una primera región objetivo de un ácido nucleico y una segunda región objetivo de un ácido nucleico en una muestra, de forma que la primera región objetivo es un gen o cromosoma cuyo número de copias relativo se va a estudiar, y la segunda región objetivo es un gen o cromosoma diferente presente en un número de copias normal, en el que dicho método comprende las etapas de:

- (a) proporcionar la muestra que comprende el ácido nucleico;
- (b) hibridar una o más primeras sondas a la primera región objetivo;
- 25 (c) hibridar una o más segundas sondas a la segunda región objetivo, de forma que el número y/o la posición de las segundas sondas en la segunda región objetivo difiere del número y/o la posición de las primeras sondas en la primera región objetivo;
- (d) detectar el número y/o la posición de las primeras sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la primera región objetivo;
- 30 (e) detectar el número y/o la posición de las segundas sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la segunda región objetivo;

en el que una diferencia entre el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (d) y el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (e) es indicativa de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de la primera y la segunda regiones objetivo de un ácido nucleico en la muestra; y

en el que las etapas de detección (d) y (e) comprenden un método de detección basado en nanoporos.

35 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para la detección de una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma en una muestra, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar la muestra que comprende el ácido nucleico;
- (b) hibridar una o más primeras sondas a la primera región objetivo;
- 40 (c) hibridar una o más segundas sondas a la segunda región objetivo, de forma que la primera región objetivo es un gen o cromosoma cuyo número de copias relativo se va a estudiar, y la segunda región objetivo es un gen o cromosoma diferente presente en un número de copias normal, y de forma que el número y/o la posición de las segundas sondas en la segunda región objetivo difiere del número y/o la posición de las primeras sondas en la primera región objetivo;
- 45 (d) detectar el número y/o la posición de las primeras sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la primera región objetivo;
- (e) detectar el número y/o la posición de las segundas sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la segunda región objetivo;

50 en el que una diferencia entre el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (d) y el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (e) es indicativa de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de la primera y la segunda regiones objetivo de un ácido nucleico en la muestra, y en el que la detección de una diferencia cuantitativa es indicativa de una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma; y

en el que las etapas de detección (d) y (e) comprenden un método de detección basado en nanoporos.

La invención de estos aspectos, por lo tanto, proporciona una aproximación más selectiva para comparar directamente los distintivos totales generados por los ácidos nucleicos en conjunto en una muestra en vez de analizar los ácidos nucleicos a nivel de nucleótidos individuales. Estos aspectos de la invención, por lo tanto, proporcionan métodos que generan muchos menos datos, y por lo tanto mejoran significativamente la eficacia del procedimiento de diagnóstico.

En una realización, la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden un ácido peptidonucleico (APN), bis-APN o ADN, tal como ADN monocatenario (ssADN). En una realización adicional, la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden APN o bis-APN. Los ácidos peptidonucleicos (APNs) son una clase importante de análogos artificiales de ácido nucleico que son oligómeros neutros con un esqueleto similar a un péptido sobre el cual se injertan las nucleobases en una secuencia diseñada. Las moléculas de bis-APN consisten en dos oligómeros de APN conectados por un ligador flexible (Singer *et al* (2010) Nano Lett. 10, 738-742). En una realización adicional, la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden bis-APN o una variante del mismo (tal como APN pseudocomplementario o y-APN). Sin limitarse por la teoría, se cree que el bis-APN se une a una de las dos cadenas de la región objetivo del ácido nucleico con una elevada afinidad y con especificidad de secuencia en virtud de los pares de bases de Watson-Crick y Hoogsteen. Se apreciará que la hibridación de la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas se llevará a cabo de acuerdo con la metodología conocida.

En una realización, la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden uno o más oligonucleótidos, tal como un oligonucleótido de 10 a 25 pares de bases, en particular un oligonucleótido de 10 a 15 pares de bases.

En una realización, la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden una etiqueta o marcador detectable. La presencia de tal etiqueta o marcador aumentará enormemente la capacidad de las etapas de detección (d) y (e) para poder detectar el distintivo asignado a la primera y segunda regiones objetivo. Tal etiqueta o marcador se puede incorporar en la sonda durante la amplificación. Los ejemplos de etiquetas o marcadores adecuados incluyen moléculas y/o partículas fluorescentes, magnéticas o radiactivas. Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen FAM - 6 carboxifluoresceína o TET - tetraclorofluoresceína.

También se describe cuando la etapa de detección de las etapas (d) y (e) comprende un método de detección basado en citometría de flujo, un método de detección basado en la piezoelectricidad o un método de detección basado en una PCR digital.

La PCR digital implica múltiples análisis mediante PCR con ácidos nucleicos extremadamente diluidos, de forma que las amplificaciones más positivas reflejan la señal de una molécula molde individual, lo que permite el recuento de las moléculas molde individuales. La proporción de amplificaciones positivas entre el número total de PCRs analizado permite una estimación de la concentración de molde en la muestra original sin diluir. Se ha demostrado que el proceso de PCR digital es de utilidad particular en la detección molecular de la aneuploidía cromosómica fetal (Lo *et al*, (2007) PNAS 104(32), 13116-13121).

Para el análisis mediante citometría de flujo, se suspenden células o fragmentos de células en disolución y se tiñen con colorantes fluorescentes. En el citómetro de flujo, las células se fuerzan en una corriente estrecha a través de la trayectoria de una fuente de luz intensa, tal como un láser. Las partículas pasan el haz láser en fila india a una velocidad de varios miles por segundo. Cuando las células entran en el punto de luz, dispersan la luz o emiten fluorescencia. A medida que cada partícula pasa a través de la fuente de luz, se cuantifican y se almacenan sus propiedades ópticas. Se puede medir un gran número de células individualmente, y se pueden determinar las propiedades ópticas de una población de células en un tiempo corto. Muchos citómetros de flujo también tienen la capacidad de clasificar las células. Para este propósito, la corriente de la muestra se fragmenta en gotículas después del punto en el que se llevan a cabo las medidas ópticas. A las gotículas que contienen las células deseadas se les administra una carga eléctrica y se desvían en un tubo de recogida mediante la influencia de un campo electrostático.

Aunque la técnica de citometría de flujo se usa habitualmente para la medida y la detección de células, una de las aplicaciones clave de la citometría de flujo es la detección y la medida de ADN, y para evitar dudas se apreciará que los métodos de la invención requieren la citometría de flujo para analizar ADN en vez de células.

En una realización particular, la etapa de detección de las etapas (d) y (e) comprende un método de detección basado en nanoporos como se definió anteriormente en la presente memoria. Sin limitarse por la teoría, un nucleótido de una molécula de ADN que pasa por un nanoporo de una membrana que tiene una corriente baja aplicada a ella dejará un distintivo específico creando un potencial diferencial. Estas señales se registran, y se genera una secuencia de nucleótidos. Los métodos de detección con nanoporos disponibles habitualmente son capaces de reconocer las moléculas de ADN bicatenarias frente a las monocatenarias o las moléculas de ADN tricatenarias (si el marcador de hibridación es una molécula de APN) frente a las bicatenarias. La ventaja de tal técnica reside en la velocidad y la baja cantidad de material analizado.

También se describe cuando la etapa de detección de las etapas (d) y (e) comprende el uso de un método de detección con placa piezoeléctrica, tal como un método de extracción por hibridación basado en microesferas,

mediante el uso de un método de detección con placa piezoeléctrica para la cuantificación del analito. Sin limitarse por la teoría, se pueden usar moléculas de unión de oligonucleótidos como agentes de captura para unir el oligonucleótido objetivo de la muestra, y extraerlo para el análisis. Las moléculas de unión de oligonucleótidos se pueden unir a microesferas o a biotina u otras moléculas (que incluyen anticuerpos) para ayudar en su papel como agentes de captura.

Si se usan microesferas magnéticas, se puede determinar el número de microesferas magnéticas unidas, y por lo tanto la concentración del analito (oligonucleótido objetivo) de la muestra, por medio de su adherencia a una placa piezoeléctrica, con el cambio consiguiente de la frecuencia de su vibración, que se puede detectar electrónicamente con gran exactitud. Los ejemplos de la metodología de detección piezoeléctrica adecuada se pueden hallar en los documentos US 2009/293590, US 2009/168068, WO 2009/035732, US 2009/282902, WO 2008/019694, US 2006/105471, US 2006/014270, US 2005/186684, WO 2004/001392, WO 2004/001417, WO 2004/001416, WO 01/26138, US 6.161.426, US 5.447.845, WO 2006/119308, WO 2007/030155 y la solicitud de patente del R.U. N° 1002627.6.

En una realización, el número de las segundas sondas difiere del número de las primeras sondas. Tal diferencia de número permitirá que la primera región objetivo se diferencie de la segunda región objetivo en virtud de un distintivo específico de las medidas de las sondas asociadas a la primera región objetivo que diferirá en número del distintivo específico de las medidas de las sondas asociadas a la segunda región objetivo. Por ejemplo, mediante el uso del método de detección basado en nanoporos descrito anteriormente en la presente memoria, la segunda sonda creará un número determinado de picos de señal característicos de la presencia del número determinado de segundas sondas hibridadas a la segunda región objetivo cuando se hace pasar la muestra a través del nanoporo. Además, la primera sonda creará un número diferenciado de picos de señal característicos de la presencia de un número diferente de primeras sondas hibridadas a la primera región objetivo cuando se hace pasar la muestra a través del nanoporo. El número de sondas en cada región objetivo, por lo tanto, comprende un distintivo específico muy similar a un "código de barras" que permitirá inmediatamente la diferenciación entre la presencia de una primera región objetivo de una segunda región objetivo.

En una realización, la posición de las segundas sondas difiere de la posición de las primeras sondas. Tal diferencia de distancia entre cada una de las sondas permitirá que la primera región objetivo se diferencie de la segunda región objetivo en virtud de un perfil específico de las medidas de las sondas asociadas a la primera región objetivo que diferirá en el perfil del distintivo específico de las medidas de las sondas asociadas a la segunda región objetivo. Por ejemplo, mediante el uso del método de detección basado en nanoporos descrito anteriormente en la presente memoria, la segunda sonda creará un número determinado de picos de señal característicos de la distancia entre el número determinado de segundas sondas hibridadas a la segunda región objetivo cuando se hace pasar la muestra a través del nanoporo. Además, la primera sonda creará un número diferenciado de picos de señal característicos de la presencia de una distancia diferente entre las primeras sondas hibridadas a la primera región objetivo cuando se hace pasar la muestra a través del nanoporo. Como se discutió anteriormente en la presente memoria, la distancia de las sondas en cada región objetivo, por lo tanto, comprende un código de barras que permitirá inmediatamente la diferenciación entre la presencia de una primera región objetivo de una segunda región objetivo.

En una realización, el número y la posición de las segundas sondas difiere del número y la posición de las primeras sondas. Tal diferencia en número y distancia entre cada una de las sondas permitirá que la primera región objetivo se diferencie de la segunda región objetivo en virtud de un perfil específico de las medidas de las sondas asociadas a la primera región objetivo que diferirá en el perfil del distintivo específico de las medidas de las sondas asociadas a la segunda región objetivo. Por ejemplo, mediante el uso del método de detección basado en nanoporos descrito anteriormente en la presente memoria, la segunda sonda creará un número determinado de picos de señal característicos del número y la distancia entre el número determinado de segundas sondas hibridadas a la segunda región objetivo cuando se hace pasar la muestra a través del nanoporo. Además, la primera sonda creará un número diferenciado de picos de señal característicos de la presencia de un número y distancia diferentes entre las primeras sondas hibridadas a la primera región objetivo cuando se hace pasar la muestra a través del nanoporo. Como se discutió anteriormente en la presente memoria, el número y la distancia de las sondas en cada región objetivo, por lo tanto, comprende un código de barras que permitirá inmediatamente la diferenciación entre la presencia de una primera región objetivo de una segunda región objetivo.

Las referencias en la presente memoria a los términos "distintivo" o "código de barras", cuando se aplican al método de detección con nanoporos, se refieren al perfil obtenido de un nucleótido que pasa a través de un poro por medio de la aplicación de un campo eléctrico. Tal perfil puede incluir, por ejemplo, la duración del paso del nucleótido a través del poro junto con la amplitud observada de la corriente durante ese paso. Los distintivos electrónicos se pueden visualizar, por ejemplo, mediante una representación de la corriente (p.ej. pA) frente al tiempo. También se prevé el distintivo electrónico para un ADN, y puede ser, por ejemplo, una representación de la corriente (p.ej. pA) frente al tiempo para que el ADN pase a través del poro por medio de la aplicación de un campo eléctrico.

La invención tiene la ventaja de que se puede detectar una diferencia muy pequeña en el número de copias de un gen o de un cromosoma. La invención puede incrementar la sensibilidad de la detección cuantitativa de un ácido nucleico respecto de los métodos de amplificación de PCR existentes detectando todas y cada una de las moléculas que contienen sondas, y es capaz de diferenciar las moléculas que contienen la primera sonda de las moléculas que

contienen la segunda sonda para proporcionar fácilmente y con exactitud una medida sensible de un número de copias en exceso.

5 El método se puede aplicar de manera ventajosa para la detección de diferencias cuantitativas en la secuencia de ADN presente en diferentes grupos de células somáticas en el mismo organismo o en el diagnóstico prenatal de afecciones hereditarias.

La invención es ventajosa, ya que el método no depende de SNPs o modificaciones epigenéticas, y por lo tanto no se limita a un porcentaje seleccionado de la población.

10 Una anomalía en un número de cromosomas puede ser una copia adicional de un cromosoma completo o de parte de un cromosoma, o una copia que falta de un cromosoma completo o de parte de un cromosoma. Un número de copias adicional de un cromosoma puede ser dos o más copias, o tres o más copias, del cromosoma o de parte del cromosoma, es decir, en el que el cromosoma o parte del cromosoma está por triplicado (también conocido en la técnica como una "trisomía"). Por ejemplo, existen tres copias del cromosoma 21 en un sujeto con síndrome de Down en comparación con dos copias en un sujeto sin síndrome de Down. Una copia que falta de un cromosoma puede dar como resultado una única copia o la inexistencia copias, de un cromosoma en vez de las dos copias normales en un sujeto sano/no afectado (o una copia en el caso de los cromosomas sexuales en los machos).

15 Una anomalía en un número de copias de un gen en un sujeto puede ser una o más copias adicionales de un gen respecto del número de copias medio del gen en una muestra de sujetos de una población general. Una anomalía en un número de copias de un gen en un sujeto puede ser una o más reducciones del número de copias de un gen respecto del número de copias medio del gen en una muestra de sujetos de una población general. La muestra de los sujetos de una población general puede comprender uno o más individuos que no tienen síntomas de una enfermedad asociada con el gen.

En una realización, la primera región objetivo del ácido nucleico está asociada a una anomalía, tal como una enfermedad, y la segunda región objetivo del ácido nucleico se usa como un control/patrón.

25 La primera región objetivo puede ser una parte de un gen, operón, o cromosoma que está asociado a una enfermedad, discapacidad u otro síndrome clínico, y la segunda región objetivo puede ser parte de un gen, operón, o cromosoma que se usa como control/patrón, que se sabe que está presente en un número de copias normal, o viceversa.

30 La primera región objetivo de un ácido nucleico puede comprender al menos parte de una región de un cromosoma humano seleccionado de cualquiera del grupo que comprende el número de cromosoma 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, el cromosoma X, y el cromosoma Y. En una realización, la primera región objetivo de un ácido nucleico comprende una región de un cromosoma humano seleccionado del grupo que comprende el número de cromosoma humano 8, 9, 13, 16, 18, 21, y 22.

35 La primera región objetivo de un ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico de al menos parte del gen HER2/neu (*c-erbB-2*) o al menos parte del gen p53. La primera región objetivo de un ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico de al menos parte del gen *c-myc*, el gen IL-6, el gen EGRF (gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico), gen BMI, o gen de cadherina 7. La primera región objetivo de un ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico de al menos parte de cualquiera del grupo de genes que comprende *c-MYC*, *VEGFA*, *MMP9*, *PTEN*, *int-2/FGF3*, *KRAS*, *EBF1*, *IKZF1*, *GATA6*, *AKT2*, *MYB*, *SMAD4*, *CDKN2A*, *TOP2A*, receptores de estrógeno, progesterona, *HER1*, *uPAR*, *uPA*, *MET*, *RET*, *GLI*, *AKT2*, *CCND1* (ciclina D1), *EGFR*, *ERBB2*, *MYCN*, y *MYCL1*.

45 Una ventaja de la primera región objetivo de un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos parte de un gen específico, tal como al menos parte del gen HER2/neu (*c-erbB-2*), es que se pueden detectar las mutaciones o cambios del número de copias de este gen. El gen HER2/neu (*c-erbB-2*) está implicado en algunos cánceres de mama. Mientras tanto, el gen de la familia Myc puede estar implicado en leucemias, cánceres de pulmón, y cánceres de mama; el gen IL-6 y EGRF en tumores neurológicos; el gen BMI en linfomas; y el gen de cadherina 7 en tumores de próstata y testiculares.

50 La segunda región objetivo de un ácido nucleico puede comprender al menos parte de una región de un cromosoma humano de cualquiera del grupo que comprende el número de cromosoma 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, el cromosoma X, y el cromosoma Y. La segunda región objetivo de un ácido nucleico puede comprender una región de un cromosoma humano seleccionado del grupo que comprende el cromosoma 1, cromosoma 2, cromosoma 7, cromosoma 9, cromosoma 10, cromosoma 11 y cromosoma 14.

La segunda región objetivo de un ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico de al menos parte del gen constitutivo que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) o la Beta-actina.

55 La segunda región objetivo de un ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico de al menos parte de una secuencia que normalmente está en el mismo número de copias que la primera región objetivo de un ácido nucleico. La segunda región objetivo puede ser una secuencia sumamente conservada (por ejemplo,

sumamente conservada en seres humanos) de un ácido nucleico. La segunda región objetivo de un ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico de cualquier secuencia o gen de copia simple que no está presente en el mismo cromosoma que la primera región objetivo, por ejemplo, SLIT1 o PI3KADP1.

5 La primera y/o segunda regiones objetivo de un ácido nucleico pueden tener una longitud de entre alrededor de 10 y alrededor de 8000 pares de bases; o una longitud de entre alrededor de 20 y alrededor de 2000 pares de bases; o una longitud de entre alrededor de 50 y alrededor de 1000 pares de bases. La primera y/o segunda regiones objetivo de un ácido nucleico pueden tener una longitud menor de 500 pares de bases, de manera alternativa una longitud menor de 300 pares de bases, y de manera alternativa una longitud menor de 200 pares de bases. La primera y/o
10 segunda regiones objetivo de un ácido nucleico pueden tener una longitud de entre alrededor de 100 y alrededor de 200 pares de bases. En una realización, la primera y segunda regiones objetivo de un ácido nucleico son similares en longitud, tal como dentro del 10%, de manera alternativa dentro del 20%, entre sí.

En una realización, la primera y segunda secuencias objetivo tienen longitudes diferentes.

15 La primera y segunda secuencias objetivo pueden incluir diferentes marcadores que permiten distinguirlas. Por ejemplo, la primera secuencia puede portar un primer fluoróforo y la segunda secuencia puede portar un segundo fluoróforo, en los que el primer y segundo fluoróforos pueden ser diferentes.

En algunos casos, solamente parte de un cromosoma está en un número de copias en exceso (p.ej. trisomía parcial) o en un número de copias reducido (p.ej. deleción o monosomía), así, es ventajoso seleccionar una región particular que se sabe que está en un número de copias en exceso o en un número de copias reducido, y que provoca síntomas de una anomalía cromosómica o enfermedad relacionada.

20 La detección de una anomalía en un número de copias de un cromosoma puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección que es una anomalía cromosómica numérica hereditaria.

25 La detección de una anomalía en un número de copias de un cromosoma puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección seleccionada del grupo que comprende el síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Edwards (trisomía 18), síndrome de Patau (trisomía 13), trisomía 9, síndrome de Warkany (trisomía 8), síndrome del ojo de gato (4 copias del cromosoma 22), trisomía 22, y trisomía 16. Además, o de manera alternativa, la detección de una anomalía en el número de copias de un gen, de un cromosoma, o de parte de un cromosoma, puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección seleccionada del grupo que comprende el síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p-), síndrome de Cri du chat (5p-), síndrome de Williams-Beuren (7-), síndrome de Jacobsen (11-), síndrome de Miller-Dieker (17-), síndrome de Smith-Magenis (17-), síndrome de deleción 22q11.2 (también conocido como síndrome velocardiocfacial, síndrome de DiGeorge, síndrome de anomalía facial conotruncal, aplasia tímica congénita, y síndrome de Strong), síndrome de Angelman (15-), y síndrome de Prader-Willi (15-).

35 Además, o de manera alternativa, la detección de una anomalía en el número de copias de un cromosoma puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección seleccionada del grupo que comprende el síndrome de Turner (síndrome de Ullrich-Turner o monosomía X), síndrome de Klinefelter, síndrome 47,XXY o XXY, síndrome 48,XXYY, síndrome 49 XXXXY, síndrome Triple X, síndrome XXXX (también denominado tetrasomía X, cuádruple X, o 48,XXXX), síndrome XXXXX (también denominado pentasomía X o 49,XXXXX), y síndrome XYY.

Además, o de manera alternativa, la detección de una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección seleccionada de cualquiera del grupo enumerado en la Tabla 1:

40 Tabla 1 Anormalidades Cromosómicas y Enfermedad

Anormalidad Cromosómica		Asociación a Enfermedad
X,Y	XO	síndrome de Turner
	XXY	síndrome de Klinefelter
	XYY	síndrome de Doble Y
	XXX	síndrome de Trisomía X
	XXXX	síndrome de Cuatro X
	deleción Xp21	síndrome de Duchenne/Becker, hipoplasia suprarrenal congénita, enfermedad granulomatosa crónica
	deleción Xp22	deficiencia de esteroide sulfatasa
	deleción Xq26	enfermedad linfoproliferativa asociada a X
1	1p- (somático)	neuroblastoma

ES 2 578 384 T3

	monosomía	
	trisomía	
2	monosomía	
	trisomía 2q	retraso del crecimiento, retraso del desarrollo y mental, y anomalías físicas leves
3	monosomía	
	trisomía (somática)	linfoma no Hodgkin
4	monosomía	
	trisomía (somática)	leucemia no linfocítica aguda (LNLA)
5	5p-	Cri du chat; síndrome de Lejeune
	5q- (somático)	síndrome mielodisplásico
	monosomía	
	trisomía	
6	monosomía	
	trisomía (somática)	sarcoma de células claras
7	deleción 7q11.23	síndrome de William
	monosomía	síndrome de monosomía 7 de la infancia; somático: adenomas corticales renales; síndrome mielodisplásico
	trisomía	
8	deleción 8q24.1	síndrome de Langer-Giedon
	monosomía	
	trisomía	síndrome mielodisplásico; síndrome de Warkany; somático: leucemia mielógena crónica
9	monosomía 9p	síndrome de Alfi
	monosomía	
	trisomía parcial 9p	síndrome de Rethore
	trisomía	síndrome de trisomía 9 completa; síndrome de trisomía 9 en mosaico
10	monosomía	
	trisomía (somática)	LLA o LNLA
11	11p-	Aniridia; tumor de Wilms
	11q-	síndrome de Jacobson
	monosomía (somática)	linajes mieloides afectados (LNLA, SMD)
	trisomía	
12	monosomía	
	Trisomía (somática)	LLC, tumor de células granulosas infantil (TCGI)
13	13q-	síndrome 13q-; síndrome de Orbeli
	deleción 13q14	retinoblastoma
	monosomía	
	trisomía	síndrome de Patau
14	monosomía	
	trisomía (somática)	trastornos mieloides (SMD, LNLA, LMC atípica)

15	delección 15q11-q13	síndrome de Prader-Willi, de Angelman
	monosomía	
	trisomía (somática)	linajes mieloides y linfoides afectados, p.ej., SMD, LNLA, LLA, LLC)
16	delección 16q13.3	Rubenstein-Taybi
	monosomía	
	trisomía (somática)	carcinomas de células renales papilares (malignos)
17	17p- (somático)	síndrome 17p en neoplasias malignas mieloides
	delección 17q11.2	Smith-Magenis
	17q13.3	Miller-Dieker
	monosomía	
	trisomía (somática)	adenomas corticales renales
	trisomía 17p11.2-12	síndrome de Charcot-Marie Tooth Tipo 1; HNPP
18	18p-	síndrome de monosomía parcial 18p o síndrome de Grouchy-Lamy-Thieffry
	18q-	síndrome de Grouchy-Lamy-Salmon-Landry
	monosomía	
	Trisomía	síndrome de Edwards
19	monosomía	
	trisomía	
20	20p-	síndrome de trisomía 20p
	delección 20p11.2-12	Alagille
	20q-	somático: SMD, LNLA, policitemia vera, leucemia neutrofílica crónica
	monosomía	
	trisomía (somática)	carcinomas de células renales papilares (malignos)
21	monosomía	
	trisomía	síndrome de Down
22	delección 22q11.2	síndrome de DiGeorge, síndrome velocardiofacial, síndrome de anomalía facial conotruncal, síndrome de Opitz G/BBB autosómico dominante, síndrome cardiofacial de Caylor
	monosomía	
	trisomía	síndrome de trisomía 22 completa

La detección de una anomalía en el número de copias de un gen puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección relacionada con el cáncer.

- 5 La detección de una anomalía en un número de copias de un gen puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección seleccionada del grupo que comprende el cáncer de mama, leucemia, cáncer de pulmón, tumores neurológicos, linfomas, cáncer de próstata y cáncer testicular.

Además, o de manera alternativa, la detección de una anomalía en un número de copias de un gen puede comprender la detección y/o el diagnóstico de una afección provocada o asociada a un número de copias adicionales o a un número de copias reducido de un gen.

- 10 La invención proporciona el uso del método de la invención, como se describió anteriormente, para determinar si un individuo tiene un incremento o una disminución en el número de copias de un gen o de un cromosoma.

También se describe un método de diagnóstico para determinar si un individuo tiene un incremento o una disminución en el número de copias de un gen o de un cromosoma llevando a cabo cualquier método de la invención de la presente memoria.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de cualquier método de la invención para detectar una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma en una muestra para al menos dos genes o cromosomas diferentes.

5 El método se puede usar para detectar una anomalía en un número de copias de un gen o de un cromosoma para al menos tres, cuatro, cinco, seis o más genes o cromosomas diferentes. Se puede usar una matriz, por ejemplo una matriz multipocillo.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de cualquier método según el método de la presente memoria para determinar si un individuo tiene un incremento o una disminución en el número de copias de un gen o de un cromosoma.

10 El término "diagnóstico" usado en la presente memoria se refiere a la capacidad de demostrar una probabilidad incrementada de que un sujeto tenga, o no tenga, una afección o afecciones específicas o que una afección o afecciones existentes tengan ciertas características específicas, tales como sensibilidad/resistencia a la terapia.

También se describe el uso del método de cualquier otro aspecto de la invención para determinar la elección del tratamiento para una afección.

15 La afección puede ser el cáncer. La elección del tratamiento puede ser una elección del régimen y/o agente de quimioterapia.

También se describe un kit que comprende una o más primeras sondas y una o más segundas sondas, como se definen en la presente memoria, adecuadas para llevar a cabo el método según la invención de la presente memoria, e instrucciones.

20 La invención se describirá a continuación con referencia a las Figuras adjuntas, en las que:

El método de la invención se puede llevar a cabo extrayendo inicialmente ADN libre de células de una muestra de plasma obtenida de una mujer embarazada.

25 De acuerdo con la invención, el ADN del plasma se puede hibridar después de manera adecuada con sondas oligonucleotídicas específicas de ADN o APN mostradas como círculos en la Figura 1 que se diseñarán para dejar un distintivo específico para la muestra de ADN hibridada (mostrada como "ADN Objetivo, p.ej. cromosoma 21" y "ADN de Referencia" en la Figura 1) que puede ser reconocible y cuantificable. Las moléculas de ADN se pueden detectar y contar después mediante un mecanismo (mostrado como "A" en la Figura 1) que puede comprender en general cualquiera de las metodologías mencionadas anteriormente en la presente memoria (es decir, la tecnología de nanoporos), de forma que se contarán las moléculas de ADN objetivo y de referencia y se compararán entre sí para dar como resultado datos de secuencia. Los datos de secuencia se pueden usar después para generar datos relevantes, tales como los niveles de ADN relativos que se han hallado, y los datos relevantes se pueden introducir en un módulo estadístico que tiene la capacidad de comparar y fijar umbrales de diagnóstico con un sistema iterativo para llegar a un diagnóstico sensible y eficaz.

35 Como se muestra en la Figura 2, de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, el ADN de plasma se puede hibridar de manera adecuada con sondas que pueden ser bis-APN (cuadrados blancos de la Figura 2) o sondas oligonucleotídicas de APN o ADN (cuadrados grises de la Figura 2), que pueden portar además (en ciertas realizaciones de la invención) marcadores covalentes. Estas se pueden diseñar para hibridar con el ADN de plasma en forma nativa (bicatenaria) (formando estructuras triples), o, de manera alternativa, tras la desnaturalización hasta la forma monocatenaria.

40 La Figura 3 demuestra una aplicación adecuada de la presente invención para detectar la trisomía 21 (es decir, un exceso del cromosoma 21 (Cr. 21) en comparación con otros cromosomas, es decir, el cromosoma 1 (Cr. 1)). Por ejemplo, el panel superior de la Figura 3 demuestra 4 primeras sondas de ADN o APN hibridadas a una primera región objetivo (es decir, el cromosoma 21) que tienen un espaciado específico y uniforme entre las 4 primeras sondas. El siguiente panel de la Figura 3 demuestra 4 segundas sondas de ADN o APN hibridadas a una segunda región objetivo (es decir, el cromosoma 1). Se puede observar claramente a partir de este panel de la Figura 3 que el espaciado de las sondas hibridadas al cromosoma 1 difiere de las sondas hibridadas al cromosoma 21. Los dos paneles inferiores de la Figura 3 muestran la misma disposición de sondas basada en la hibridación de bis-APN al ADN bicatenario (dsADN).

50 Las Figuras 4 y 5 demuestran gráficamente cómo se puede llevar a cabo el recuento de moléculas individuales (fragmentos de ADN) basándose en el "distintivo" característico generado por la colocación espacial de las sondas unidas a lo largo de los fragmentos de ADN, lo que a su vez genera un código temporal a medida que la molécula pasa a través del dispositivo de nanoporo. Por ejemplo, la señal obtenida en la Figura 4 es una señal de cuatro picos espaciados uniformemente que corresponden al distintivo específico o código de barras representativo del cromosoma 21 (independientemente de si se usan sondas de ADN, APN o bis-APN). En contraste, la señal obtenida en la Figura 5 es característica de dos grupos de señales de dos picos espaciados uniformemente que corresponden al distintivo específico o código de barras representativo del cromosoma 1 (una vez más, independientemente de si

se usan sondas de ADN, APN o bis-APN).

La etapa final del procedimiento puede comprender en general el análisis de los datos resultantes obtenidos mediante recuento de moléculas para cuantificar las moléculas (fragmentos de ADN) en exceso. Por ejemplo, un embarazo de un feto con trisomía 21 se caracterizará por la presencia del cromosoma 21 en exceso en comparación con uno o más cromosomas de referencia, tales como el cromosoma 1.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de una primera región objetivo de un ácido nucleico y una segunda región objetivo de un ácido nucleico en una muestra, de forma que la primera región objetivo es un gen o cromosoma cuyo número de copias relativo se va a estudiar, y la segunda región objetivo es un gen o cromosoma diferente presente en un número de copias normal, en el que dicho método comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar la muestra que comprende el ácido nucleico;
- (b) hibridar una o más primeras sondas a la primera región objetivo;
- 10 (c) hibridar una o más segundas sondas a la segunda región objetivo, de forma que el número y/o la posición de las segundas sondas en la segunda región objetivo difiere del número y/o la posición de las primeras sondas en la primera región objetivo;
- (d) detectar el número y/o la posición de las primeras sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la primera región objetivo;
- 15 (e) detectar el número y/o la posición de las segundas sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la segunda región objetivo;
- en el que una diferencia entre el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (d) y el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (e) es indicativa de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de la primera y la segunda regiones objetivo de un ácido nucleico en la muestra; y
- en el que las etapas de detección (d) y (e) comprenden un método de detección basado en nanoporos.
- 20 2. Un método para la detección de una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma en una muestra, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar la muestra que comprende el ácido nucleico;
- (b) hibridar una o más primeras sondas a la primera región objetivo;
- 25 (c) hibridar una o más segundas sondas a la segunda región objetivo, de forma que la primera región objetivo es un gen o cromosoma cuyo número de copias relativo se va a estudiar, y la segunda región objetivo es un gen o cromosoma diferente presente en un número de copias normal, y de forma que el número y/o la posición de las segundas sondas en la segunda región objetivo difiere del número y/o la posición de las primeras sondas en la primera región objetivo;
- (d) detectar el número y/o la posición de las primeras sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la primera región objetivo;
- 30 (e) detectar el número y/o la posición de las segundas sondas identificadas en las moléculas de ácido nucleico de la muestra como un distintivo específico asignable a la presencia de la segunda región objetivo;
- en el que una diferencia entre el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (d) y el número de distintivos específicos obtenidos en la etapa (e) es indicativa de una diferencia cuantitativa entre la cantidad de la primera y la segunda regiones objetivo de un ácido nucleico en la muestra, y en el que la detección de una diferencia cuantitativa es indicativa de una anomalía en el número de copias de un gen o de un cromosoma; y
- 35 en el que las etapas de detección (d) y (e) comprenden un método de detección basado en nanoporos.
3. Un método como se definió en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden un ácido peptidonucleico (APN), bis-APN o ADN, tal como ADN monocatenario (ssADN).
- 40 4. Un método como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden uno o más oligonucleótidos, tal como un oligonucleótido de 10 a 25 pares de bases, en particular un oligonucleótido de 10 a 15 pares de bases.
5. Un método como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la o las primeras sondas y/o la o las segundas sondas comprenden una etiqueta o marcador detectable.
- 45 6. Un método como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un único nanoporo de un diámetro menor de 10 nm, tal como un diámetro menor de 5 nm, en particular un diámetro de 4 a 5 nm.
7. Un método como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nanoporo comprende una membrana de nitruro de silicio (SiN).

8. Un método como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra es plasma sanguíneo materno, que comprende un ácido nucleico fetal.

5 9. Un método como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la anomalía comprende tres copias del cromosoma 21 en un sujeto con síndrome de Down en comparación con dos copias en un sujeto sin síndrome de Down.

10. El uso de un método como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para determinar si un individuo tiene un incremento o una disminución del número de copias de un gen o de un cromosoma.

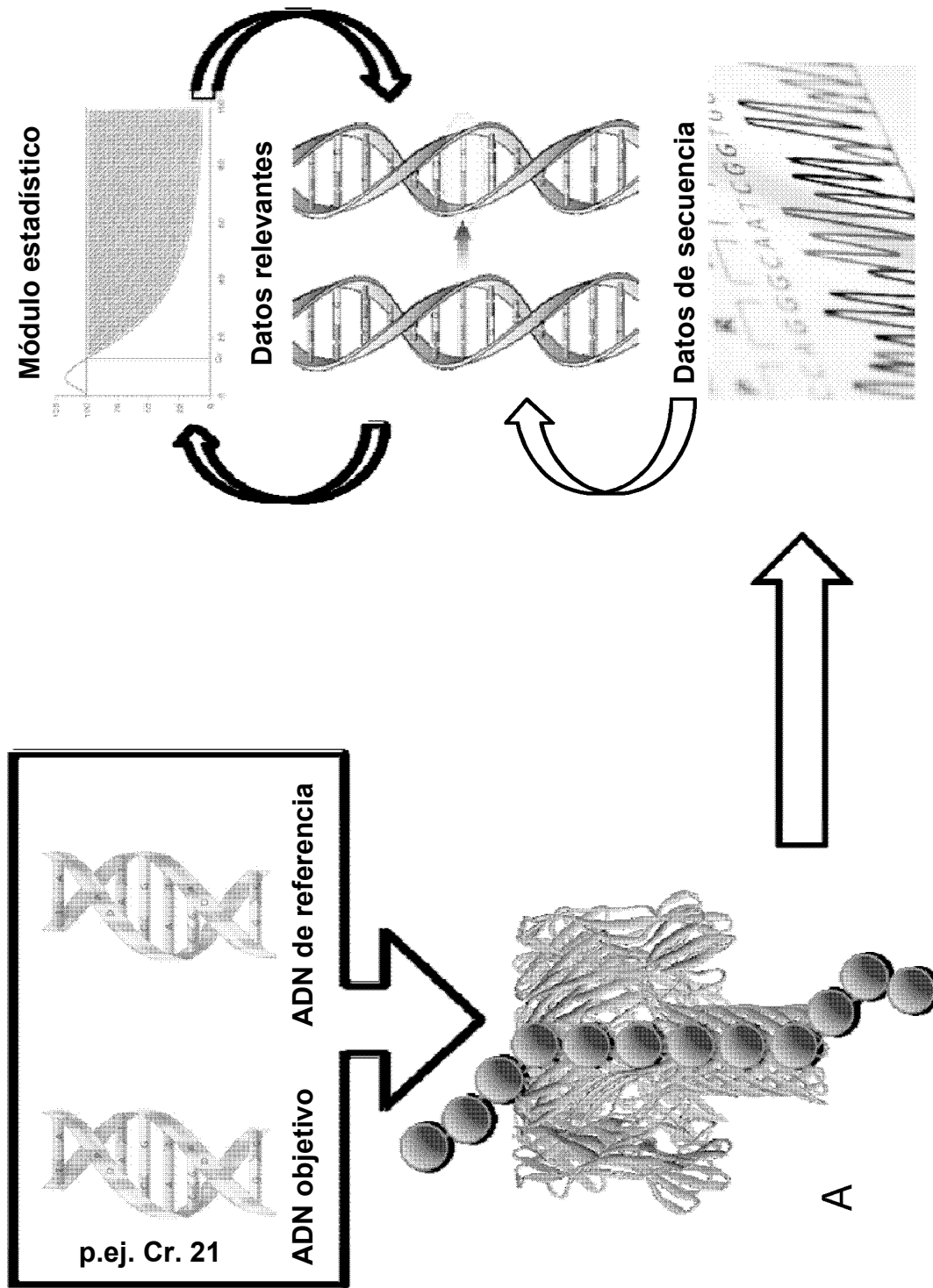


FIGURA 1

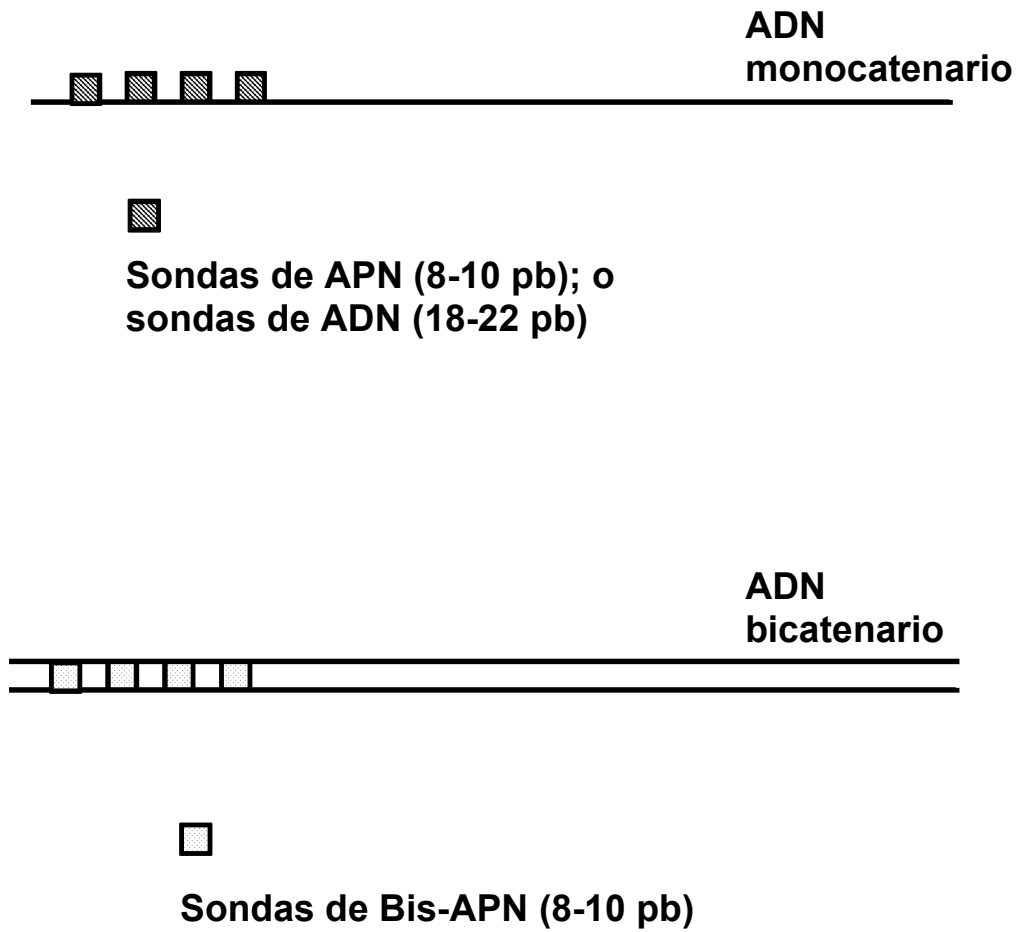


FIGURA 2

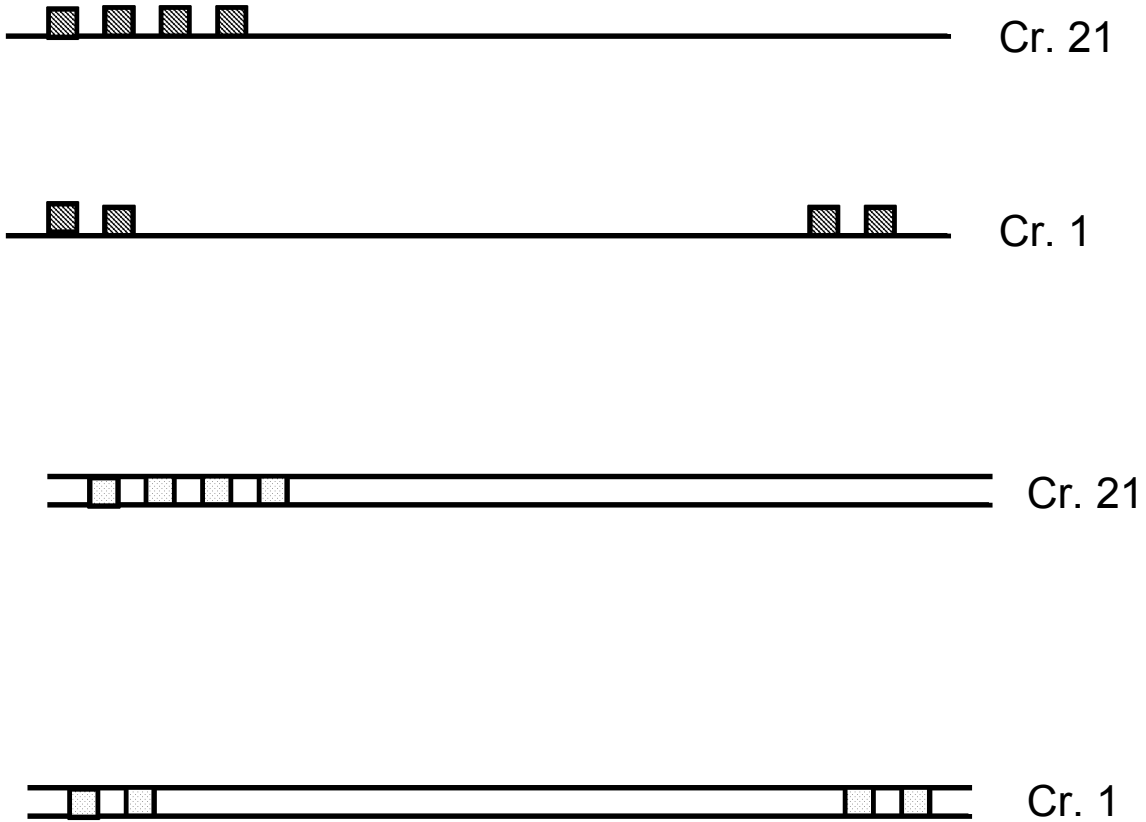
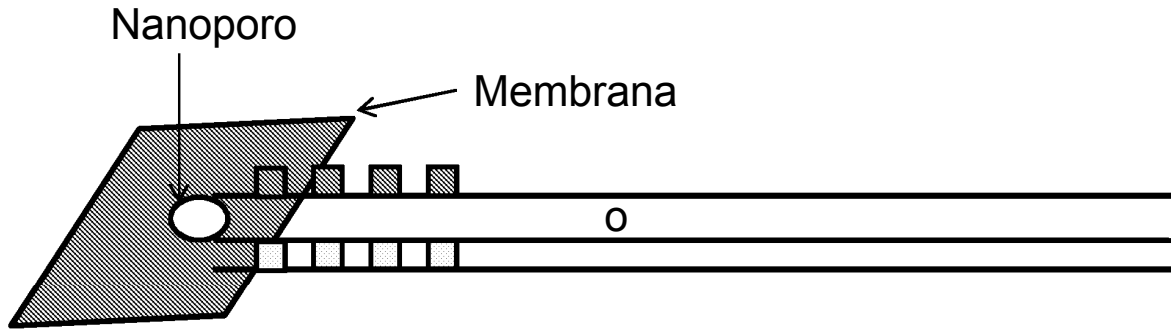
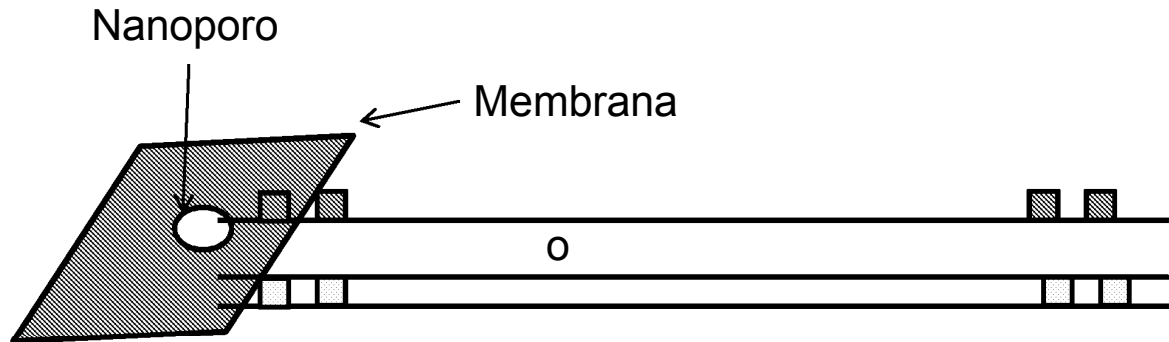


FIGURA 3



← Señal generada para los fragmentos del Cr. 21

FIGURA 4



Señal generada para los fragmentos del Cr. 1 de referencia

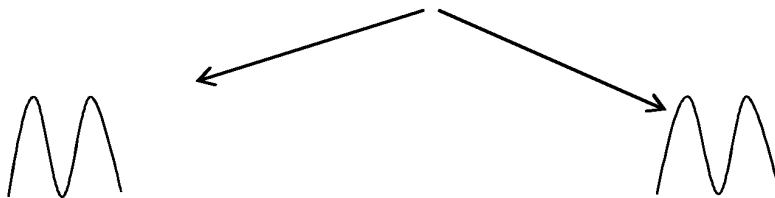


FIGURA 5