

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 954**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2007 PCT/GB2007/001625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2007 WO07132166**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2007 E 07732658 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2016190**

54 Título: **Nuevo marcador fetal de metilación**

30 Prioridad:

03.05.2006 US 797506 P
06.04.2007 US 784501

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2017

73 Titular/es:

THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG
(100.0%)
Research and Technology Administration Office,
Room 226 Pi Chiu Building Shatin
Nt Hong Kong Sar, CN

72 Inventor/es:

LO, YUK MING, DENNIS;
CHIU, ROSSA WAI KWUN;
CHIM, STEPHEN SIU CHUNG;
DING, CHUNMING;
CHAN, KWAN CHEE;
WONG, HING NAM IVY y
YUEN, KA CHUN RYAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 608 954 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

Nuevo marcador fetal de metilación

5 **Antecedentes de la invención**

10 La detección precoz de las afecciones relacionadas con el embarazo, incluyendo posibles complicaciones durante el embarazo o parto y los defectos genéticos del feto, es de crucial importancia, ya que permite una intervención médica temprana necesaria para la seguridad tanto de la madre como del feto. El diagnóstico prenatal se ha llevado a cabo rutinariamente utilizando células aisladas del feto mediante procedimientos como la obtención de muestras de las vellosidades coriónicas (CVS) o la amniocentesis. Estos métodos convencionales son, sin embargo, invasivos y presentan un riesgo apreciable tanto para la madre como para el feto a pesar de que la manipulación se realice cuidadosamente (Tabor et al., Lancet 1:1287-1293, 1986).

15 Se han desarrollado alternativas a estas estrategias invasivas para el cribado prenatal, por ejemplo, para detectar anomalías fetales, tras los descubrimientos de que se pueden encontrar varios tipos de células fetales en la circulación materna (Johansen et al., Prenat. Diagn. 15:921-931, 1995) y, lo que es más importante, se puede detectar ADN fetal libre de células circulantes en plasma y suero materno (Lo et al., Lancet 350:485-487, 1997). Se ha demostrado que la cantidad de ADN fetal en la sangre materna es suficiente para el análisis genético sin tratamiento complejo del plasma o el suero, en contraste con los métodos alternativos que requieren etapas para aislar y enriquecer células fetales. Desde entonces se han conseguido el genotipado rhesus D (RhD) de fetos (Lo et al., N. Engl. J. Med. 339:1734-1738, 1998), La determinación del sexo del feto (Costa et al., N. Engl. J. Med. 346:1502, 2002), y el diagnóstico de varios trastornos fetales (Amicucci et al., Clin. Chem. 46:301-302, 2000; Saito et al., Lancet 356:1170, 2000; y Chiu et al., Lancet 360:998-1000, 2002) mediante la detección de ADN fetal en plasma o suero materno utilizando una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

20 Además, se han descrito anomalías cuantitativas del ADN fetal en el plasma/suero materno en la preeclampsia (Lo et al., Clin. Chem. 45:184-188, 1999 y Zhong et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 184:414-419, 2001), trisomía fetal 21 (Lo et al., Clin. Chem. 45:1747-1751, 1999 y Zhong et al., Prenat. Diagn. 20:795-798, 2000) e hiperemesis gravídica (Sekizawa et al., Clin. Chem. 47:2164-2165, 2001). La detección de ácido nucleico fetal en sangre materna para el análisis genético prenatal también se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 6.258.540.

25 Debido a que el ADN fetal coexiste con el ADN materno en la porción acelular de la sangre de una mujer embarazada, por ejemplo, suero o plasma, existe la necesidad de distinguir el ADN de origen fetal del de origen materno para garantizar que se obtienen resultados precisos en el diagnóstico fetal basado en ADN. Se describió por primera vez en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 09/944.951, publicada como 20030044388, que el ADN fetal y el materno pueden distinguirse por sus diferentes perfiles de metilación. Landes et al. en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030211522 también propusieron el uso de marcadores de metilación diferenciales de para el diagnóstico prenatal. Por otro lado, para asegurar la eficacia de los métodos de ensayo basados en el ADN fetal y eliminar la interpretación errónea de los resultados del ensayo debido a la insuficiente recuperación de ADN fetal obtenido a partir de tales métodos, existe también la necesidad de determinar la presencia y la cantidad de ADN fetal en una muestra utilizada para el procedimiento de ensayo. Por lo tanto, es deseable identificar un marcador de ADN fetal que pueda servir con eficacia como indicador universal de la presencia o ausencia de ADN fetal en general en una muestra de ensayo. Es importante que dicho marcador de ADN fetal sea consistente y uniformemente distinto de su homólogo materno y que la presencia o ausencia del marcador pueda determinarse fácilmente sobre el fondo de ADN materno y correlacionar directamente con la presencia o ausencia de ADN fetal en general. La presente invención aborda esta y otras necesidades relacionadas.

30 En la presente solicitud se han identificado por primera vez una serie de genes humanos como los que tienen patrones de metilación altamente distintos en tejidos fetales (por ejemplo, derivados de placenta) y en tejidos maternos. Procedentes de un feto, estos genes se metilan a un alto nivel de uniformidad, mientras que los genes de una fuente materna que libera una cantidad significativa de ADN libre de células en la sangre materna no están metilados a un nivel similarmente alto de uniformidad. Estas características permiten que los genes sirvan de forma eficaz como controles positivos internos de una muestra de ensayo utilizada en un proceso de diagnóstico prenatal, con el propósito de asegurar que se ha recuperado una cantidad suficiente de ADN fetal en la muestra durante el proceso. Debido al alto nivel de uniformidad en el estado de metilación de estos genes con respecto a su origen, estos genes son controles particularmente fiables, indicativos tanto de la calidad como de la cantidad del ADN fetal. Otra ventaja de estos genes como marcadores fetales es la relativa facilidad en detectar solo la versión fetal metilada en contraste con sus homólogos maternos no metilados. Además, los genes fetales descritos en la presente solicitud también pueden usarse directamente como marcadores de diagnóstico para ciertas afecciones o trastornos relacionados con el embarazo.

35 **Breve resumen de la invención**

65 En el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia de ADN fetal en una muestra biológica de una mujer embarazada. Este método incluye las etapas siguientes: (a) tratar la muestra

con un agente que modifica diferencialmente el ADN metilado y no metilado; y (b) detectar la secuencia de ADN de *RASSF1A*, en la muestra. La presencia de la secuencia de ADN indica la presencia de ADN fetal en la muestra, mientras que la ausencia de la secuencia de ADN indica la ausencia de ADN fetal en la muestra.

5 En la invención, la muestra de una mujer embarazada es plasma o suero de sangre entera. En algunas realizaciones, el agente capaz de modificar diferencialmente el ADN metilado y no metilado digiere el ADN no metilado, pero no el ADN metilado. Este agente puede ser una enzima sensible a la metilación, particularmente una enzima de restricción sensible a la metilación, tal como *Hpa* II o *Bst*U I. En otras realizaciones, el agente puede contener bisulfito.

10 En algunas realizaciones, la etapa (b) del método comprende un proceso de amplificación. En una realización de ejemplo, el proceso de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR en tiempo real. En otras realizaciones, la etapa (b) determina la cantidad de la secuencia de ADN.

15 En algunas realizaciones, cuando la etapa (b) indica la presencia de ADN fetal en la muestra, el método puede incluir las etapas adicionales de: c) determinar la cantidad de Una segunda secuencia fetal de ADN en una segunda muestra. La segunda muestra es idéntica a la muestra en la etapa (a) antes de ser tratada con el agente que modifica diferencialmente el ADN metilado y no metilado, y la segunda secuencia no es *RASSF1A*, y (d) comparar la cantidad de la segunda secuencia con un control estándar. Cuando se detecta un aumento en la cantidad de la
20 segunda secuencia del control, se interpreta como indicador de la presencia de una afección asociada con el embarazo o un riesgo aumentado de desarrollar tal afección. En algunos casos, la segunda muestra en la etapa (c) no se trata con ningún agente que modifique diferencialmente el ADN metilado y no metilado, mientras que, en otros casos, la segunda muestra en la etapa (c) se trata con el agente antes de determinar la cantidad de la segunda. Por ejemplo, la segunda muestra en la etapa (c) se trata con un segundo agente diferente que modifica diferencialmente
25 el ADN metilado y no metilado antes de determinar la cantidad de la segunda secuencia de ADN fetal. Este método es adecuado para detectar la presencia de varias afecciones relacionadas con el embarazo o un mayor riesgo de desarrollar una durante el embarazo. Algunos ejemplos de esta afección incluyen preeclampsia, parto prematuro y retraso del crecimiento intrauterino (RCIU).

30 En otras realizaciones, cuando la etapa (b) indica la presencia de ADN fetal en la muestra, el método puede comprender las etapas adicionales de: (c) detectar una segunda secuencia fetal de ADN en una segunda muestra. La segunda muestra es idéntica a la muestra de la etapa (a) antes de ser tratada con el agente y la segunda secuencia es un gen de un tipo sanguíneo RhD, un gen de un tipo sanguíneo ABO, un gen de tipo sanguíneo RhC, Un gen de un tipo de sangre RhE, un gen de un tipo HLA o un gen localizado en el cromosoma Y, o un gen que
35 contiene una mutación predeterminada, en el que la presencia de la segunda secuencia indica la presencia del tipo sanguíneo RhD particular, el tipo sanguíneo ABO particular, el tipo sanguíneo RhC particular, el tipo sanguíneo RhE particular, el tipo de HLA particular, el cromosoma Y o la mutación predeterminada dentro del gen en el genoma fetal. En algunos casos, la segunda muestra en la etapa (c) no se trata con ningún agente que modifique diferencialmente el ADN metilado y no metilado. Opcionalmente, la etapa (c) comprende un proceso de
40 amplificación. En una realización de ejemplo, el proceso de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR en tiempo real.

45 En el segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una afección asociada con el embarazo en mujeres embarazadas. Este método incluye las etapas siguientes: (a) tratar una muestra biológica que es sangre entera, plasma o suero, obtenida de la mujer con un agente que modifica diferencialmente el ADN metilado y no metilado; (b) detectar la cantidad de secuencia de ADN de *RASSF1A*, en la muestra; y (c) comparar la cantidad de la secuencia de ADN con un control estándar, en el que un aumento con respecto al control indica la presencia o un riesgo aumentado de desarrollar la afección asociada con el embarazo.

50 En algunas realizaciones, el agente capaz de modificar diferencialmente el ADN metilado o no metilado digiere el ADN no metilado, pero no el ADN metilado. Una posibilidad es que el agente sea una enzima sensible a la metilación, tal como una enzima de restricción sensible a la metilación (por ejemplo, *Hpa* II o *Bst*U I). Otra posibilidad es que el agente comprende bisulfito.

55 En algunas realizaciones, la etapa (b) del método comprende un proceso de amplificación, que puede efectuarse por diversos medios, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR en tiempo real. Este método es adecuado para el diagnóstico, la monitorización o la evaluación del riesgo de una serie de afecciones asociadas con el embarazo, entre las que se incluyen preeclampsia, parto prematuro y retraso del crecimiento intrauterino (RCIU).

60 **Breve descripción de los dibujos**

Figure 1. Secuencias del cebador, la sonda y el calibrador estándar para secuencias de *RASSF1A* (SEQ ID NOS:1-8), *APC* (SEQ ID NOS:9 y 10) y *RARB* (SEQ ID NOS:11-14) y condiciones de la reacción de PCR.

65

Figura 2. Estado de metilación de la isla CpG de *RASSF1A* en tejidos de la placenta del (a) primer y (b) tercer trimestre y las correspondientes células sanguíneas maternas. Los sitios CpG analizados se numeran en serie y se nombran según el acceso de GenBank de *RASSF1* (Homo sapiens) NM_007182 con el codón de iniciación de su secuencia de codificación de la proteína como la posición +1 (entre paréntesis). El primer sitio CpG (-113) corresponde a chr3: 50353354 (cadena inversa) del genoma humano en el buscador de genomas UCSC (ensamblaje de mayo de 2004, hg17). Los círculos llenos y sin llenar representan sitios CpG metilados y no metilados, respectivamente.

Figura 3. Estado de metilación de la isla CpG de *APC* y *RARB* en tejidos de la placenta del (a) primer y (b) tercer trimestre y las correspondientes células sanguíneas maternas. Para *APC*, los sitios CpG analizados se nombran de acuerdo con el acceso en GenBank NM_000038 con el codón de iniciación de su secuencia de codificación de la proteína como posición +1. El primer sitio CpG (-17371) corresponde a chr5: 112101115 del genoma humano en el buscador de genomas UCSC (ensamblaje de mayo de 2004, hg17). Para *RARB*, los sitios CpG analizados se nombran de acuerdo con el acceso en GenBank NM_016152 con el codón de iniciación de su secuencia de codificación de la proteína como posición +1. El primer sitio CpG (-73231) corresponde a chr3: 25444475 del genoma humano en el buscador de genomas UCSC (ensamblaje de mayo de 2004, hg17). Los círculos llenos y sin llenar representan sitios CpG metilados y no metilados, respectivamente.

Figura 4. Secuencias del cebador, la sonda y del calibrador estándar para *CASP8* (SEQ ID NOS: 15-18) y condiciones de reacción de la PCR.

Figura 5. Estado de metilación de CpG de *CASP8* en tejidos de la placenta del (a) primer y (b) tercer trimestre y las correspondientes células sanguíneas maternas. Los sitios CpG analizados se nombran de acuerdo con el acceso en GenBank NM_033355 de *CASP8* (Homo sapiens) con el codón de iniciación de su secuencia de codificación de la proteína como posición +1. El primer sitio CpG (-8167) corresponde a chr2: 201948550 del genoma humano en el buscador de genomas UCSC (ensamblaje de mayo de 2004, hg17). Los círculos llenos y sin llenar representan sitios CpG metilados y no metilados, respectivamente.

Figura 6. Secuencias del cebador, la sonda y el calibrador estándar para *SCGB3A1* (SEQ ID NOS: 19-22) y condiciones de la reacción PCR.

Figura 7. Estado de metilación de CpG de *SCGB3A1* en tejidos de la placenta del tercer trimestre y las correspondientes células sanguíneas maternas. Los sitios CpG analizados se nombran de acuerdo con el acceso en GenBank NM_052863 de *SCGB3A1* (Homo sapiens) con el codón de iniciación de su secuencia de codificación de la proteína como posición +1. El primer sitio CpG (-390) corresponde a chr5: 179951435 del genoma humano en el buscador de genomas UCSC (ensamblaje de mayo de 2004, hg17).

Figura 8. Amplificación selectiva de la secuencia de ADN metilado. Los círculos conectados a la secuencia génica significan sitios de escisión de la enzima de restricción sensible a la metilación. Los círculos abiertos y rellenos representan secuencias no metiladas y metiladas, respectivamente, en estos sitios de escisión de enzimas de restricción sensibles a la metilación. La digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación escinde la secuencia de ADN no metilada en los sitios de restricción enzimática. Como resultado, solo se pudo detectar la secuencia de ADN metilado no escindida en la etapa de amplificación por PCR en tiempo real.

Figura 9. (a) Gráficos de la amplificación por PCR en tiempo real para *RASSF1A* en muestras de ADN de la capa leucocitaria de la placenta y materna. Después de la digestión de la enzima de restricción sensible a la metilación, se detectó la secuencia de *RASSF1A* en la muestra de ADN placentaria, pero no se detectó en la muestra de ADN de la capa leucocitaria materna. (b) Amplificación mediante PCR en tiempo real para secuencias de β -actina en muestras de ADN de la capa leucocitaria de la placenta y materna. Después de la digestión enzimática, no se detectó β -actina en el ADN de la capa leucocitaria de la placenta o materna. (c) Estado de metilación de CpG de β -actina en tejidos de la placenta del tercer trimestre y las correspondientes células sanguíneas maternas. Los sitios CpG analizados se nombran de acuerdo con el acceso en GenBank M10277 del gen de la beta-actina citoplasmática humana con el codón de iniciación de su secuencia de codificación de la proteína como posición +1. El primer sitio CpG (-970) corresponde a chr7: 5536879 del genoma humano en el buscador de genomas UCSC (ensamblaje de mayo de 2004, hg17).

Figura 10. (a) Diagrama esquemático que muestra el principio de la amplificación selectiva de la secuencia *RASSF1A* derivada del feto en el ADN del plasma materno. Los círculos conectados a la secuencia génica significan sitios de escisión de la enzima de restricción sensible a la metilación. Los círculos abiertos y rellenos representan secuencias no metiladas y metiladas, respectivamente, en estos sitios de escisión de enzimas de restricción sensibles a la metilación. La digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación digiere específicamente el ADN no metilado en los sitios de restricción enzimática. Como resultado, las secuencias de *RASSF1A* (Rsf) y β -actina derivadas de la madre, así como la secuencia de la β -actina derivada del feto, serían digeridas, dejando secuencias de *RASSF1A* derivadas del feto detectables. Las flechas rellenas y abiertas representan los cebadores para PCR dirigidos a los genes *RASSF1A* y de β -actina, respectivamente. Por lo tanto, solo se pudo detectar la secuencia de *RASSF1A* derivada del feto mediante el sistema de PCR en tiempo

real. (b) Diagrama esquemático que ilustra la detección de la digestión enzimática incompleta por el control interno del sistema de β -actina. Cuando la digestión enzimática sensible a la metilación es incompleta, algunas secuencias de *RASSF1A* y β -actina derivadas de la madre, así como algunas secuencias de β -actina derivadas del feto, permanecerían en la muestra de ADN. En este caso, la señal de *RASSF1A*, que puede provenir de secuencias tanto maternas como fetales derivadas de una digestión incompleta, no es específica para el ADN fetal. Este sistema de control interno está diseñado para minimizar la detección de falsos positivos debido a la digestión enzimática incompleta.

Figura 11. Gráficos de amplificación en tiempo real para *RASSF1A* y β -actina para las muestras de ADN plasmático de una mujer embarazada en el tercer trimestre (a) y una mujer embarazada en el primer trimestre (b). Después de la digestión enzimática, la secuencia de *RASSF1A* permaneció detectable en el plasma materno de ambas mujeres. El desplazamiento a la derecha de la curva de amplificación se debe a la reducción de la cantidad de la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión de las secuencias de *RASSF1A* derivadas de la madre por la enzima de restricción sensible a la metilación. En contraste, las secuencias de β -actina fueron digeridas por la enzima y, por lo tanto, no se pudieron detectar. Se analizaron las muestras de ADN plasmático libre de células de 71 mujeres embarazadas. Veintiocho de ellas estaban en el primer trimestre de su embarazo y 43 de ellas estaban en el tercer trimestre. Las secuencias de *RASSF1A* fueron detectables en **TODAS** las muestras de ADN plasmático después de la digestión enzimática sensible a la metilación.

Figura 12. Gráficos de la amplificación en tiempo real para *RASSF1A* y β -actina para el ADN del plasma materno de una mujer no embarazada. Después de la digestión enzimática, no se detectó ninguna secuencia de *RASSF1A* o de β -actina en la muestra de ADN de plasma. En las 25 mujeres no embarazadas reclutadas para este estudio, ninguna mostró señal de *RASSF1A* detectable en el plasma después de la digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación.

Figura 13. En este caso, los genotipos de *RASSF1A* de la madre (ADN de la capa leucocitaria materna) y el feto (ADN de la placenta) fueron AC y CC, respectivamente. Sin digestión enzimática, el genotipo *RASSF1A* del plasma materno era idéntico al de la madre, que era AC. Después de la digestión enzimática, el genotipo *RASSF1A* del plasma materno cambió a CC, que era idéntico al genotipo placentario (fetal).

Figura 14. Correlaciones de las concentraciones de la secuencia *SRY* frente a la secuencia de *RASSF1A* en el plasma materno con o sin digestión enzimática para 24 mujeres embarazadas en el tercer trimestre. Todos los sujetos llevaban un feto masculino. Hubo una correlación positiva entre las concentraciones de *SRY* y *RASSF1A* en el plasma materno con digestión enzimática ($r = 0,717$, $p < 0,0001$, correlación de Spearman). Sin embargo, no existe correlación alguna entre las concentraciones de *SRY* y el *RASSF1A* total medidas sin digestión enzimática ($r = 0,228$, $p = 0,280$, Spearman).

Figura 15. Diagrama esquemático que muestra la estrategia de las pruebas no invasivas de rhesus fetal D en mujeres embarazadas.

Figura 16. La concentración de la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática en el plasma materno era elevada en los embarazos preeclámpsicos.

Figura 17. Secuencias del cebador para secuenciación con bisulfito de *DAB2IP*(SEQ ID NOS: 23-26) y condiciones de reacción de la PCR.

Figura 18. Estado de metilación de CpG de *DAB2IP* en una muestra de tejido de la placenta del tercer trimestre y las correspondientes células sanguíneas maternas. Los sitios CpG analizados se nombran de acuerdo con el acceso en GenBank NM_032552 de *DAB2IP* (Homo sapiens) con el codón de iniciación de su secuencia de codificación de la proteína como posición +1. El primer sitio CpG (-59572) corresponde a chr9: 121541221 del genoma humano en el buscador de genomas UCSC (ensamblaje de mayo de 2004, hg17). Los círculos llenos y sin llenar representan sitios CpG metilados y no metilados, respectivamente.

Definiciones

La expresión "**trastorno asociado al embarazo**", tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere a cualquier afección o enfermedad que pueda afectar a una mujer embarazada, al feto que la mujer lleva o tanto a la mujer como al feto. Tal afección o enfermedad puede manifestar sus síntomas durante un período de tiempo limitado, por ejemplo, durante el embarazo o el parto, o puede durar toda la vida del feto después de su nacimiento. Algunos ejemplos de un trastorno asociado con el embarazo incluyen preeclampsia, parto prematuro y retraso del crecimiento intrauterino (RCIU).

En la presente solicitud, las expresiones "**ácido nucleico**" o "**polinucleótido**" se refieren a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y a polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares como ácido nucleico de referencia y que se

metabolizan de un modo similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta también abarca implícitamente variantes de la misma modificadas de forma conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degeneradas), alelos, ortólogos, mutaciones que incluyen mutaciones puntuales, polimorfismos de nucleótido único (SNP) y secuencias complementarias, así como la secuencia que se indica explícitamente. Específicamente se pueden conseguir sustituciones de codones degeneradas generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer y col., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini y col., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc y ARNm codificados por un gen.

El término "**gen**" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región de codificación (líder y trasera) implicadas en la transcripción/traducción del producto génico y la regulación de la transcripción/traducción, así como secuencias intermedias entre segmentos codificantes individuales (exones).

En la presente solicitud, los términos "**polipéptido**", "**péptido**" y "**proteína**" se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), en las que los residuos de aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes.

El término "**aminoácido**" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican después, por ejemplo hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina.

En el presente documento se puede hacer referencia a los aminoácidos bien por sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente o por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Asimismo, se puede hacer referencia a los nucleótidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

El término "**bisulfito**", tal como se usa en el presente documento, abarca todos los tipos de bisulfitos, tales como bisulfito de sodio, que son capaces de convertir químicamente una citosina (C) en un uracilo (U) sin modificar químicamente una citosina metilada y, por lo tanto, pueden usarse para modificar diferencialmente una secuencia de ADN basada en el estado de metilación del ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento, un reactivo que "**modifica diferencialmente**" el ADN metilado o no metilado abarca cualquier reactivo que modifique el ADN metilado y/o no metilado en un proceso a través del cual se obtienen productos distinguibles a partir de ADN metilado y no metilado, de modo que se permite la identificación del estado de metilación del ADN. Estos procesos pueden incluir, sin limitaciones, reacciones químicas (tales como una conversión de C \rightarrow U por bisulfito) y el tratamiento enzimático (tal como la escisión por una endonucleasa dependiente de metilación). De este modo, una enzima que escinde o digiere preferentemente ADN metilado es una capaz de escindir o digerir una molécula de ADN con una eficacia mucho mayor cuando el ADN está metilado, mientras que una enzima que escinde o digiere preferentemente el ADN no metilado exhibe una eficacia significativamente mayor cuando el ADN no está metilado.

En la presente solicitud, la palabra "**presencia**" o "**ausencia**" se usa en un sentido relativo para describir el nivel de una secuencia de ADN concreta. En otras palabras, cuando se dice que una determinada secuencia de ADN o un gen está "presente" en una muestra de ensayo, significa que el nivel de esta secuencia de ADN o gen está por encima de un umbral predeterminado; mientras que cuando una secuencia de ADN o gen está "ausente" cuando su nivel en una muestra de ensayo está por debajo de dicho umbral.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, un "**aumento**" o una "**disminución**" se refiere a un cambio detectable positivo o negativo en la cantidad con respecto a un control estándar establecido. Un incremento es un cambio positivo, preferiblemente al menos 10 %, más preferiblemente 50 %, aún más preferiblemente de 2 veces, incluso más preferiblemente de al menos 5 veces, y, lo más preferiblemente, de al menos 10 veces el valor de control. De forma similar, una disminución es un cambio negativo, preferiblemente de al menos el 10 %, más preferiblemente del 50 %, todavía más preferiblemente de al menos 80 % y, lo más preferiblemente, de al menos 90 % del control. En la presente solicitud se usan otros términos que indican cambios cuantitativos o diferencias de una base comparativa, tales como "**más**" o "**menos**", de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Un "**método de hibridación de polinucleótidos**", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un método para detectar la presencia y/o la cantidad de un polinucleótido basado en su capacidad para formar apareamiento de bases de Watson-Crick, en condiciones de hibridación apropiadas, con una sonda polinucleotídica

de una secuencia conocida. Ejemplos de tales métodos de hibridación incluyen transferencia Southern y transferencia Northern.

"Cebadores", tal como se usan en el presente documento, se refieren a oligonucleótidos que pueden usarse en un método de amplificación, tal como una reacción en cadena de polimerasa (PCR), para amplificar una secuencia de nucleótidos basada en la secuencia polinucleotídica correspondiente a un gen de interés, por ejemplo *RASSF1A*, *APC*, *CASP8*, *RARB*, *SCGB3A1*, *DAB2IP*, *PTPN6*, *THY1*, *TMEFF2*, o *PYCARD*, metilados o no metilados. Al menos uno de los cebadores para PCR para la amplificación de una secuencia polinucleotídica es específico de secuencia para la secuencia.

"Valor de control estándar, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad predeterminada de una secuencia genómica que procedente de un feto y que está presente en una muestra establecida. El valor de control estándar es adecuado para el uso de un método de la presente invención, con el fin de comparar la cantidad de un gen de interés (o una secuencia no codificante) que está presente en una muestra de ensayo. Una muestra establecida que sirve como control estándar proporciona una cantidad promedio de un gen fetal de interés que es típico durante un tiempo definido (por ejemplo, el primer trimestre) durante el embarazo en la sangre de una mujer media embarazada normal, sana, portadora de un feto normal ninguno de los cuales presenta riesgo de desarrollar trastornos o complicaciones asociadas con el embarazo. Un valor de control estándar puede variar dependiendo de la secuencia genómica de interés y la naturaleza de la muestra.

El término "**promedio**", tal como se utiliza en el contexto de describir una mujer embarazada, se refiere al hecho de que la mujer está libre de al menos una afección de relevancia, tal como una afección asociada con el embarazo (por ejemplo, preeclampsia o parto prematuro). El término "promedio", cuando se usa en otro contexto, se refiere a ciertas características, tales como la cantidad o el estado de metilación de un gen particular tanto de origen materno como fetal que se encuentra en la sangre de la mujer, que son representativas de un grupo seleccionado de mujeres sanas que están embarazadas con fetos cromosómicamente normales y que no son susceptibles a ninguna enfermedad o afección relacionada con el embarazo. Este grupo seleccionado debe comprender un número suficiente de mujeres, de modo que la cantidad promedio o el perfil de metilación del gen de interés entre estas mujeres refleje, con una precisión razonable, el perfil correspondiente en la población general de mujeres embarazadas sanas con fetos sanos. Además, el grupo seleccionado de mujeres en general tiene una edad gestacional similar a la de una mujer cuya sangre se analiza para la indicación de un posible trastorno asociado al embarazo. La edad gestacional preferente para la práctica de la presente invención puede variar dependiendo del trastorno que se esté buscando. Por ejemplo, el cribado en una mujer embarazada para detectar el riesgo de preeclampsia se realiza, preferiblemente, durante el segundo trimestre del embarazo, mientras que el cribado de aneuploidía cromosómica fetal se realiza y se diagnostica lo antes posible. Además, la edad gestacional preferida para la prueba también puede depender del gen que interesa analizar.

El término "preeclampsia", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una afección que se produce durante el embarazo, cuyo principal síntoma es varias formas de presión arterial alta que a menudo se acompaña de la presencia de proteínas en la orina y edema (hinchazón). La preeclampsia, a veces llamada toxemia del embarazo, está relacionada con un trastorno más grave llamado "eclampsia", que es preeclampsia junto con convulsiones. Estas afecciones generalmente se desarrollan durante la segunda mitad del embarazo (después de 20 semanas), aunque pueden desarrollarse poco después del nacimiento o antes de las 20 semanas de embarazo.

El término "**parto prematuro**", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección en la que el parto comienza más de tres semanas antes del período completo de la gestación de aproximadamente 40 semanas, que conduce a menudo al nacimiento prematuro si no se trata.

La expresión "**retraso del crecimiento intrauterino (RCIU)**" se refiere a una afección en la cual el crecimiento del feto es anormalmente lento, su peso por debajo del percentil 10 para la edad gestacional. Cuando nace, el lactante parece demasiado pequeño y desnutrido para su edad. El RCIU, también denominado restricción del crecimiento intrauterino, se asocia con un mayor riesgo de enfermedad médica y muerte en el recién nacido.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, "**un gen de un tipo sanguíneo RhD, de un tipo sanguíneo ABO, de un tipo sanguíneo RhC, de un tipo de sangre RhE, de tipo HLA o en el cromosoma Y**" se refiere a un gen que se reconoce como representativo de un tipo de sangre en particular de acuerdo con la tipificación de sangre RhD, ABO, RhC o RhE, o un tipo de HLA concreto, o un gen que se encuentra localizado en el cromosoma Y. La detección de tal gen en el ADN fetal es indicativa de que el feto tiene un tipo sanguíneo concreto, un tipo HLA o el sexo masculino.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presencia de ADN fetal en el plasma materno se notificó por primera vez en 1997, ofreciendo la posibilidad de un diagnóstico prenatal no invasivo simplemente mediante el análisis de una muestra de sangre materna (Lo et al.,

Lancet 350:485-487, 1997). La coexistencia de ADN fetal con ADN materno en el plasma materno, sin embargo, exige medios fiables para distinguir el ADN de origen fetal del materno. Anteriormente se ha indicado que diversos genes están metilados de forma diferencial entre sus versiones fetal y materna, véase, por ejemplo, Chim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:14753-14758, 2005.

Los presentes inventores descubrieron, por primera vez, que varios genes (por ejemplo, *RASSF1A*, *APC*, *CASP8*, *RARB*, *SCGB3A1*, *DAB2IP*, *PTPN6*, *THY1*, *TMEFF2* y *PYCARD*) derivados de un feto están altamente metilados, mientras que los mismos genes derivados de la mujer embarazada con el feto no están metilados. Aunque anteriormente se ha informado que otros genes tienen un perfil de metilación distinto cuando se comparan la versión fetal de los genes y la versión materna, el descubrimiento por los presentes inventores es único en cuanto a que no solo tal distinción del estado de metilación era desconocida con respecto a estos genes concretos, el alto nivel de uniformidad en la metilación de los genes fetales y la falta de metilación de los genes maternos tampoco se había visto anteriormente. Por tanto, este descubrimiento proporciona un enfoque nuevo, más preciso y más eficaz para distinguir el ADN genómico fetal y materno. En particular, la detección de uno cualquiera de los genes fetales identificados en el presente documento en una muestra durante un procedimiento analítico para el diagnóstico prenatal no invasivo permite confirmar que el proceso, incluyendo la obtención y manipulación de la muestra, está funcionando satisfactoriamente, tal como está diseñado en ese ADN fetal en general (no limitado a los genes citados en el presente documento) en la muestra se conserva adecuadamente tanto en calidad como en cantidad. Además, estos genes recientemente identificados también pueden utilizarse directamente como marcadores de ADN fetal para indicar la presencia o el aumento del riesgo de ciertas afecciones y complicaciones relacionadas con el embarazo, ya que estos genes están uniformemente metilados en comparación con sus homólogos maternos, lo que permite la fácil distinción entre la copia materna y la copia fetal de los genes.

II. Metodología general

La práctica de la presente invención utiliza técnicas de rutina en el campo de la biología molecular. Los textos básicos que divulgan los métodos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds., 1994).

Para los ácidos nucleicos, los tamaños se proporcionan en kilobases (kb) o en pares de bases (pb). Estos son estimaciones derivadas de la electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida, a partir de ácidos secuenciados o a partir de secuencias de ADN publicadas. Para las proteínas, los tamaños se proporcionan en kilodalton (kDa) o números de residuos de aminoácidos. Los tamaños de las proteínas se estiman a partir de la electroforesis en gel, a partir de proteínas secuenciadas, a partir de secuencias de aminoácidos secuenciados o a partir de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que están disponibles comercialmente se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo de acuerdo con el procedimiento del triéster de fosforoamidita de fase sólida descrita por primera vez por Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981), usando un sintetizador automático, como se describe en Van Devanter y col., *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos se realiza usando cualquier estrategia reconocida en la técnica, por ejemplo electroforesis en gel de acrilamida nativa o cromatografía de líquidos de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPLC), como se describe en Pearson y Reanier, *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983).

Se puede verificar cualquiera de los genes identificados en el presente documento, *RASSF1A*, *APC*, *CASP8*, *RARB*, *SCGB3A1*, *DAB2IP*, *PTPN6*, *THY1*, *TMEFF2*, y *PYCARD*, y la secuencia polinucleotídica de oligonucleótidos sintéticos utilizando, por ejemplo, el método de terminación de cadena para secuenciar moldes bicatenarios de Wallace et al., *Gene* 16: 21-26 (1981).

III. Adquisición de muestras de sangre y extracción de ADN

La presente invención se refiere a la determinación de la presencia y/o cantidad de ciertos genes fetales encontrados en la sangre materna basándose en su estado de metilación distinto para detectar la presencia y/o cantidad de ADN fetal general, que puede usarse, por ejemplo, como control interno para indicar el correcto funcionamiento de un proceso analítico no invasivo que utiliza ADN fetal para evaluar la presencia o el riesgo de una afección o trastorno asociado con el embarazo. De este modo, las primeras etapas de la práctica de la presente invención son obtener una muestra biológica de una mujer embarazada en la que se espera que el ADN fetal esté presente y tratar el ADN con un agente que modifique diferencialmente el ADN basado en el estado de metilación. Un ejemplo de tal agente es aquel que digiere solo el ADN no metilado pero no el ADN metilado. Opcionalmente, el ADN se extrae primero de la muestra.

A. Adquisición de muestras de sangre

Se obtiene una muestra de sangre de una mujer embarazada a una edad gestacional adecuada para la prueba utilizando un método diagnóstico no invasivo basado en ADN fetal. La edad gestacional adecuada puede variar

dependiendo del trastorno investigado. La obtención de sangre de una mujer se realiza de acuerdo con el protocolo estándar que generalmente siguen los hospitales o clínicas. Se obtiene una cantidad apropiada de sangre periférica, por ejemplo, normalmente entre 5-50 ml, y se puede almacenar de acuerdo con el procedimiento estándar antes de la preparación adicional.

5

B. Preparación de muestras de sangre

El análisis del ADN fetal encontrado en la sangre materna de acuerdo con la presente invención se realiza usando, por ejemplo sangre entera, suero o plasma. Los métodos para preparar suero o plasma de sangre materna son bien conocidos entre los expertos en la técnica. Por ejemplo, la sangre de una mujer embarazada se puede introducir en un tubo que contiene EDTA o un producto comercial especializado, tal como Vacutainer SST ((Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) para prevenir la coagulación sanguínea y, a continuación, el plasma puede obtenerse a partir de sangre entera mediante centrifugación. Por otra parte, se puede obtener suero con o sin centrifugación después de la coagulación de la sangre. Si se utiliza centrifugación, entonces se realiza normalmente, aunque no exclusivamente, a una velocidad apropiada, por ejemplo, 1.500-3.000 x g. El plasma o el suero pueden someterse a etapas de centrifugación adicionales antes de ser transferidos a un tubo nuevo para la extracción de ADN.

10

15

Además de la porción acelular de la sangre entera, el ADN también puede recuperarse de la fracción celular, enriquecida en la porción de capa leucocitaria, que puede obtenerse tras la centrifugación de una muestra de sangre entera de la mujer y la extracción del plasma.

20

C. Extracción de ADN

Se conocen numerosos métodos para extraer ADN de una muestra biológica, incluyendo sangre. Se pueden seguir los métodos generales de preparación de ADN (por ejemplo, descritos por Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3^a ed., 2001); también se pueden usar varios reactivos o kits disponibles comercialmente, tales como QiaAmp DNA Mini Kit o QiaAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI), y GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham, Piscataway, NJ), para obtener ADN de una muestra de sangre de una mujer embarazada. También se pueden utilizar combinaciones de más de uno de estos métodos.

25

30

IV. Modificación química del ADN específica de metilación

El ADN presente en una muestra de una mujer embarazada, extraída o no de la muestra, se trata después con un agente capaz de modificar preferentemente el ADN dependiendo de si la secuencia de ADN está metilada o no. Por ejemplo, este agente puede ser una enzima que digiere el ADN de una manera sensible a la metilación, es decir, sólo el ADN no metilado será digerido mientras que el ADN metilado permanece sin cambios. Otra posibilidad es que el agente convierte selectivamente una secuencia polinucleotídica dependiendo del estado de metilación. Normalmente, dicho agente reacciona con el resto o restos C no metilados en una molécula de ADN y convierte cada resto C no metilado en un resto uracilo (U), mientras que los restos C metilados permanecen sin cambios. Esta conversión C → U permite la detección y comparación del estado de metilación sobre la base de cambios en la secuencia primaria del ácido nucleico. Un reactivo de ejemplo adecuado para este fin es bisulfito, tal como bisulfito sódico. Los métodos para usar bisulfito para la modificación química del ADN son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hennan et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996) y no se discutirán con detalle en el presente documento.

35

40

45

Como reconocerá un experto en la técnica, cualquier otro reactivo que no se cite en el presente documento pero que tenga la misma propiedad de modificar químicamente (o mediante cualquier otro mecanismo) el ADN metilado y no metilado de forma diferencial se puede usar para practicar la presente invención. Por ejemplo, la modificación específica del ADN de la metilación puede realizarse también mediante enzimas de restricción sensibles a la metilación, algunas de las cuales normalmente escinden un fragmento de ADN no metilado, pero no un fragmento de ADN metilado, mientras que otras (por ejemplo, la endonucleasa dependiente de metilación McrBC) escinden el ADN que contienen citosinas metiladas pero no ADN no metilado. Además, se puede usar una combinación de modificación química y tratamiento con enzimas de restricción, por ejemplo, análisis combinado de restricción con bisulfito (COBRA) para la práctica de la presente invención.

50

55

V. Amplificación y determinación de la secuencia polinucleotídica

Después de la modificación diferencial dependiente de la metilación del ADN, tal como la modificación química del ADN de una manera específica de metilación o digestión enzimática sensible a la metilación, el ADN tratado se somete a continuación a un análisis basado en secuencias, de manera que *RASSF1A*, de la fuente fetal puede distinguirse de su homólogo de la fuente materna y que la presencia y la cantidad del gen o genes fetales pueden determinarse y compararse con un control estándar. Adicionalmente, una vez que se determina que *RASSF1A* de origen fetal está, de hecho, presente en la muestra, en particular cuando la cantidad del gen o genes es mayor que un umbral predeterminado, se considera que la muestra y sus equivalentes contienen suficiente cantidad de ADN fetal para análisis adicionales. Por otra parte, se puede detectar y medir la cantidad de estos genes particulares

60

65

como marcadores fetales indicativos de ciertas afecciones o trastornos relacionados con el embarazo, aprovechando el estado altamente metilado de los genes en contraste con el estado no metilado de sus homólogos de origen materno. Para este uso, la cantidad de *RASSF1A*, en una muestra de ensayo puede compararse con un valor estándar, en el que un aumento con respecto al valor estándar indica la presencia o el riesgo aumentado de tal trastorno asociado con el embarazo.

A. Amplificación de secuencias nucleotídicas

Una reacción de amplificación es opcional antes de un análisis basado en secuencias para un marcador fetal de la presente invención después del tratamiento mediante el proceso de modificación diferencial dependiente de la metilación. En algunas realizaciones de la presente invención, la amplificación se realiza para amplificar preferentemente un marcador fetal de la presente invención que tiene un patrón de metilación particular, de manera que solo se detecta y analiza la secuencia genómica de una fuente particular, por ejemplo, de la placenta o de otros tejidos del feto.

Diversos métodos de amplificación de polinucleótidos están bien establecidos y se usan con frecuencia en investigación. Por ejemplo, los métodos generales de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la secuencia polinucleotídica son bien conocidos en la técnica y, por lo tanto, no se describen con detalle en el presente documento. Para una revisión de los métodos, protocolos y principios de la PCR en el diseño de cebadores, véase, por ejemplo, Innis, et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y., 1990. Los reactivos y protocolos de la PCR también están disponibles de proveedores comerciales, tales como Roche Molecular Systems.

La PCR se lleva a cabo generalmente como un proceso automatizado con una enzima termoestable. En este procedimiento, la temperatura de la mezcla de reacción se cicla a través de una región desnaturalizante, una región de hibridación con el cebador y una región de reacción de extensión de forma automática. Las máquinas específicamente adaptadas para este fin están comercialmente disponibles.

Aunque la amplificación por PCR de una secuencia polinucleotídica diana de *RASSF1A* se usa normalmente en la práctica de la presente invención, un experto en la técnica reconocerá que la amplificación de una secuencia genómica encontrada en una muestra de sangre materna puede realizarse mediante cualquier método conocido, tal como reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción y replicación de secuencias autosostenidas o amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), cada una de las cuales proporciona suficiente amplificación. También se puede utilizar tecnología de ADN ramificado desarrollada más recientemente para demostrar cualitativamente la presencia de una secuencia genómica particular de la presente invención, que representa un patrón de metilación concreto, o para determinar cuantitativamente la cantidad de esta secuencia genómica concreta en la sangre materna. Para una revisión de la amplificación de la señal de ADN ramificado para la cuantificación directa de secuencias de ácido nucleico en muestras clínicas, véase Nolte, Adv. Clin. Chem. 33:201-235, 1998.

B. Determinación de secuencias polinucleotídicas

Las técnicas para la determinación de la secuencia polinucleotídica están también bien establecidas y ampliamente practicadas en el campo de investigación relevante. Por ejemplo, los principios básicos y las técnicas generales para la secuenciación de polinucleótidos se describen en diversos informes de investigación y tratados sobre biología molecular y genética recombinante, tales como Wallace *et al.*, citado anteriormente; Sambrook y Russell, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Los métodos de secuenciación de ADN practicados habitualmente en los laboratorios de investigación, manuales o automatizados, se pueden usar para poner en práctica la presente invención. Entre los medios adicionales adecuados para detectar cambios (por ejemplo, C → U) en una secuencia polinucleotídica para practicar los métodos de la presente invención se incluyen, pero sin limitaciones a los mismos, espectrometría de masas, extensión de cebador, hibridación polinucleotídica, PCR en tiempo real y electroforesis.

VI. **Establecimiento de un valor de control estándar**

Con el fin de establecer un valor de control estándar para la práctica del método de la presente invención, primero se selecciona un grupo de mujeres embarazadas sanas que llevan fetos sanos. Estas mujeres tienen una edad gestacional similar, que está dentro del periodo de tiempo apropiado del embarazo para el cribado de afecciones, tales como preeclampsia y parto prematuro utilizando los métodos de la presente invención.

El estado de salud de las mujeres embarazadas seleccionadas y los fetos que portan se confirma mediante métodos bien establecidos, empleados de forma rutinaria, incluyendo, pero sin limitaciones, monitorización de la presión arterial de las mujeres, registro del inicio del parto y realización de análisis genético fetal utilizando CVS y amniocentesis.

Además, el grupo seleccionado de mujeres embarazadas sanas que llevan fetos sanos debe ser de un tamaño razonable, de modo que la cantidad promedio de un gen fetal particular identificado en la presente invención presente en la sangre materna obtenida del grupo pueda considerarse razonablemente representativa de la cantidad normal o promedio o el perfil de metilación entre la población general de mujeres sanas que llevan fetos sanos. Preferiblemente, el grupo seleccionado comprende al menos 10 mujeres.

Una vez que se establece un nivel promedio para un gen fetal particular presente en la sangre materna basado en los valores individuales encontrados en cada mujer del grupo de control sano seleccionado, este valor promedio o mediana o representativo se considera un valor de control estándar. Cualquier muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre) que contenga una cantidad similar del gen fetal puede usarse, de este modo, para proporcionar un valor de control estándar para muestras del mismo tipo (por ejemplo, muestras de sangre). Además, una solución que contiene una secuencia de ADN genómico en la cantidad promedio o mediana o representativa también se puede ensamblar artificialmente y proporcionar un valor de control estándar. El valor de control estándar puede diferir de un gen a otro y dependiendo de la naturaleza de las muestras biológicas, es decir, el valor de control estándar para *RASSF1A* puede ser diferente para una muestra de plasma que para una muestra de saliva.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración únicamente y no como limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente varios parámetros no críticos que podrían modificarse o cambiarse para dar esencialmente resultados iguales o similares.

Ejemplo 1: Genes supresores de tumores que están hipermetilados en el feto en comparación con la sangre materna

El objetivo de los presentes inventores era identificar marcadores epigenéticos específicos del feto en la sangre materna. Los datos anteriores sugieren que las moléculas de ADN fetal en el plasma materno derivan predominantemente de la placenta (Chim et al., Proc Natl Acad Sci USA., 102, 14753-14758; Masuzaki et al., J Med Genet 41, 289-292, 2004; Flori et al., Hum Reprod 19, 723-724, 2004), mientras que el ADN de fondo en el plasma materno puede originarse a partir de células sanguíneas maternas (Lui et al., Clin Chem 48, 421-427, 2002). Por lo tanto, para identificar los marcadores epigenéticos fetales, se evaluaron los perfiles de metilación de los loci genómicos en tejidos placentarios y en células sanguíneas maternas con el objetivo de identificar loci que demuestren metilación diferencial entre los dos tipos de tejidos. Dichos marcadores se pueden utilizar para el diagnóstico prenatal y el control de las afecciones relacionadas con el embarazo.

Reclutamiento sujetos y recolección de muestras

Los sujetos se reclutaron en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Príncipe de Gales de Hong Kong. El estudio y la recolección de muestras clínicas humanas fueron aprobados por la junta de revisión institucional. Se solicitó el consentimiento informado de cada sujeto. Los tejidos de placenta del primer trimestre se recolectaron inmediatamente después de las interrupciones electivas del embarazo. Los tejidos de placenta del tercer trimestre se recolectaron después de una cesárea electiva de embarazos sin complicaciones. Se recogieron muestras de sangre periférica materna (12 ml de EDTA) justo antes de la realización de procedimientos obstétricos.

Procesamiento de muestras y secuenciación con bisulfito

Las muestras de sangre se centrifugaron a 1.600 g durante 10 minutos a 4 °C. Después de la eliminación del sobrenadante, la porción de células de sangre periférica se volvió a centrifugar a 2.500 g. Se eliminó adicionalmente cualquier plasma residual. El ADN se extrajo de células de sangre periférica utilizando el kit de extracción de DNA Nucleon Blood (GE Healthcare-Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) y de tejidos placentarios usando el kit QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante. El bisulfito convierte la citosina no metilada en uracilo, dejando la citosina metilada sin cambios. Las muestras de ADN extraídas se convirtieron en bisulfito usando el Kit de Modificación de ADN Universal CpGenome (Chemicon, Temecula, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada reacción de conversión, se incubaron 1 µg de ADN a 50 °C durante 16 horas después de la adición del reactivo I. Cada muestra de ADN convertida en bisulfito se sometió a PCR mediante cebadores que no discriminaban entre secuencias metiladas y no metiladas, usando un kit de PCR de GeneAmp Kit de reactivos básicos (Applied Biosystems). Cada producto de PCR posterior se clonó con TA en el vector pGEM-Teasy (Promega) para su transformación en la cepa JM109 de *E. coli*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones se escogieron aleatoriamente y, a continuación, se realizó la PCR usando los cebadores vectoriales de T7 y SP6 para amplificar los insertos clonados. La secuenciación con ciclos se realizó utilizando BigDye versión 1.1 (Applied Biosystems) y un secuenciador de ADN capilar automatizado Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se alinearon y compararon utilizando el software SeqScape (Applied Biosystems). La finalidad de la conversión de bisulfito se confirmó primero antes de marcar. Los sitios de CpG secuenciados como restos de citosina o timina se clasificaron como metilados o no metilados, respectivamente. Se calculó la frecuencia del sitio metilado para cada muestra dividiendo el número total de sitios metilados sobre todos los sitios CpG clonados.

Comparación de datos y análisis estadístico

Después de la conversión de bisulfito, se clasificó un sitio CpG como metilado si la secuencia era citosina; se clasificó como no metilado si estaba ocupado por un resto de timina (homólogo desoxi de uracilo). Se calculó la frecuencia del sitio metilado para cada muestra dividiendo el número total de sitios metilados sobre todos los sitios CpG clonados.

RASSF1A, APC y RARB

Los cebadores para PCR para la secuenciación de bisulfito y las condiciones de ciclación de PCR se enumeran en la Figura 1. Los resultados de la secuenciación con bisulfito se enumeran en las Figuras 2 y 3. Estos resultados indicaron que las secuencias de *RASSF1A*, *APC* y *RARB* estaban hipermetiladas en la placenta, pero no metiladas en las células sanguíneas maternas.

CASP8

Los cebadores para PCR para la secuenciación de bisulfito y las condiciones de ciclación de PCR se enumeran en la Figura 4. Los resultados de la secuenciación con bisulfito se enumeran en las Figuras 5. Estos resultados indicaron que las secuencias de *CASP8* estaban hipermetiladas en la placenta, pero no metiladas en las células sanguíneas maternas.

SCGB3A1

Los cebadores para PCR para la secuenciación de bisulfito y las condiciones de ciclación de PCR se enumeran en la Figura 6. Los resultados de la secuenciación con bisulfito se enumeran en las Figuras 7. Estos resultados indicaron que las secuencias de *SCGB3A1* estaban hipermetiladas en la placenta, pero en gran medida no metiladas en las células sanguíneas maternas.

Proteína de interacción con DAB2 (DAB2IP)

Los cebadores para PCR para la secuenciación de bisulfito y las condiciones de ciclación de PCR se enumeran en la Figura 17. Los resultados de la secuenciación con bisulfito para una muestra de tejido de placenta y las correspondientes células sanguíneas maternas se enumeran en la Figura 18. Estos resultados indicaron que las secuencias de *DAB2IP* estaban hipermetiladas en la placenta, pero en gran medida no metiladas en las células sanguíneas maternas.

Ejemplo 2: Digestión enzimática sensible a la metilación seguida de PCR en tiempo real

Las enzimas sensibles a la metilación son enzimas que cortan el ADN solo cuando su sitio de reconocimiento no está metilado. Para más descripción, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 2005/0158739 (Jeddeloh et al.). Por ejemplo, *BstU I* reconoce el sitio CGCG y corta el ADN cuando el CpG no está metilado. Como se muestra en la Figura 8, se puede usar más de una enzima sensible a la metilación para digerir el ADN no metilado, dejando solamente las secuencias metiladas intactas. Métodos, tales como la PCR en tiempo real, se pueden utilizar posteriormente para detectar las secuencias de ADN que todavía son amplificables después de la digestión enzimática.

MATERIALES Y MÉTODOS***Reclutamiento sujetos y recolección de muestras***

Los sujetos se reclutaron en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Príncipe de Gales de Hong Kong. El estudio y la recolección de muestras clínicas humanas fueron aprobados por la junta de revisión institucional. Se solicitó el consentimiento informado de cada sujeto. Los tejidos de placenta del tercer trimestre se recolectaron después de una cesárea electiva de embarazos sin complicaciones. Se recogieron muestras de sangre periférica materna justo antes de la realización de procedimientos obstétricos.

Procesamiento de muestras y digestión de ADN mediante enzima sensible a la metilación

Las muestras de sangre materna se centrifugaron a 1.600 g durante 10 minutos y a 16.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se extrajo ADN de los 200 µl de capa leucocitaria y 0,2 g de tejido placentario utilizando el mini kit QIAamp DNA Blood y el mini kit QIAamp DNA, respectivamente, siguiendo la recomendación del fabricante. Se digirieron cien nanogramos de ADN de la placenta y de la capa leucocitaria materna con 100 U de *BstU I*, una enzima sensible a la metilación, en tampón de digestión 1X a 60 °C durante 16 horas.

Detección por PCR en tiempo real para la secuencia de RASSF1A

La secuencia de RASSF1A se amplificó mediante PCR en tiempo real utilizando los cebadores RSF-b151F, 5'-AGCCTGAGCTCATTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:27) y RSF-dsgnR, 5'-ACCAGCTGCCGTGTGG-3' (SEQ ID NO:28), y la sonda fluorescente de unión a la ranura menor (MGB) RSF-dsgnT, 5'-FAM-CCAACGCGCTGCGCAT-MGB-3' (SEQ ID NO:29). La sincronización o el número de ciclos de PCR requeridos para la aparición de la señal fluorescente detectable se correlaciona inversamente con la cantidad de secuencia de RASSF1A en la muestra de ADN de entrada. En otras palabras, cuanto mayor sea la cantidad de secuencia de RASSF1A presente en una muestra de ADN, más temprano aparecerá la señal fluorescente, dando como resultado un número de ciclo de umbral inferior.

La Figura 9a muestra un ejemplo de cuantificación en PCR en tiempo real de moléculas de RASSF1A de la placenta y de células sanguíneas maternas después de la digestión con BstU I. Sin digestión enzimática, se detectaron moléculas de RASSF1A tanto de placenta como de la capa leucocitaria materna. Con digestión enzimática, solo se detectaron moléculas de RASSF1A de la placenta. Para moléculas de β -actina, fueron detectables solo sin digestión enzimática, independientemente de sus orígenes (Figura 9b). Se espera que la secuencia de β -actina no esté metilada. La Figura 9c muestra los resultados de secuenciación de bisulfito del gen de β -actina para la placenta y la capa leucocitaria materna. En los tejidos placentarios como la capa leucocitaria materna estaban completamente no metilados.

Ejemplo 3: Detección de RASSF1A en plasma materno tras la digestión enzimática

En el ejemplo 1, por secuenciación con bisulfito, se ha demostrado que el gen RASSF1A de las células sanguíneas maternas está completamente no metilado mientras que el de la placenta (de origen fetal) está fuertemente metilado. En el ejemplo 2, se ha demostrado que las secuencias de RASSF1A de las células sanguíneas maternas fueron completamente digeridas por una enzima de restricción sensible a la metilación, mientras que las secuencias de RASSF1A de la placenta solo fueron parcialmente digeridas por la misma enzima. El ADN plasmático se compone de ADN de origen materno (en su mayor parte a partir de células sanguíneas maternas y, por lo tanto, no está metilado) y ADN de origen fetal (siendo la placenta el principal contribuyente y, por lo tanto, está metilado para los marcadores descritos en esta solicitud de patente). Por lo tanto, es factible utilizar la digestión enzimática sensible a la metilación del ADN plasmático para eliminar el fondo de ADN materno y aumentar la concentración fraccional de las moléculas de RASSF1A derivadas de fetos en plasma materno.

Un diagrama esquemático se muestra en la Figura 10a, RASSF1A derivado de la madre está no metilado y, por lo tanto es digerido por la enzima sensible a la metilación, mientras que algo de RASSF1A derivado del feto está metilado y por lo tanto no se digiere. Si la digestión enzimática está completa, solo el ADN metilado derivado del feto se deja intacto y puede servir como molde para la amplificación por PCR. En el caso de la β -actina, puesto que tanto las secuencias de ADN materna como fetales están no metiladas, la digestión enzimática completa destruirá todas las secuencias y, por consiguiente, no se podrá lograr ninguna amplificación por PCR usando esta secuencia de β -actina. Los errores humanos y la calidad del reactivo a veces pueden causar una digestión enzimática incompleta. Por tanto, la β -actina puede usarse como control interno para indicar una digestión incompleta (Figura 10b). Si la amplificación por PCR es exitosa para β -actina después de la digestión enzimática, es probable que la digestión enzimática sea incompleta. En este caso, puede ser necesario repetir todo el ensayo hasta que se consiga un resultado negativo para el ensayo de β -actina.

MATERIALES Y MÉTODOS**Procesamiento de muestras y digestión de ADN mediante enzima sensible a la metilación**

Las muestras de sangre materna se centrifugaron a 1.600 g durante 10 minutos y a 16.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El ADN se extrajo de 1,6 ml de plasma usando el mini kit QIAamp (Qiagen) y se eluyó con 50 μ l de H₂O. Treinta y cinco microlitros de ADN plasmático se digirieron con 100 U de enzima BstU I, en tampón de digestión 1X a 60 °C durante 16 horas.

Detección por PCR en tiempo real para las secuencias de RASSF1A y de Beta-actina

La secuencia de RASSF1A se amplificó y cuantificó mediante PCR en tiempo real como se ha descrito anteriormente. La secuencia de Beta-actina se amplificó y cuantificó mediante PCR en tiempo real utilizando los cebadores Actina-163F, 5'-GCGCCGTTCCGAAAGTT-3' (SEQ ID NO:30) y Actina-298R, 5'-CGGCGGATCGGCAA-3' (SEQ ID NO:31), y la sonda fluorescente de unión a la ranura menor (MGB) Actina-243T, 5'-VIC-ACCGCCGAGACCGCGTC-MGB-3' (SEQ ID NO:32). La secuencia de SRY se amplificó y cuantificó usando los cebadores SRY-109F, 5'-TGGCGATTAAGTCAAATTCGC-3' (SEQ ID NO:33) y SRY-245R, 5'-CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT-3' (SEQ ID NO:34), y la sonda fluorescente SRY-142T, 5'-FAM-AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA-TAMRA-3' (SEQ ID NO:35). Se estableció una construcción de ADN que contenía una copia de cada uno de los amplicones RASSF1A, SRY y β -actina como el patrón cuantitativo de los tres ensayos. Se creó una curva de calibración mediante diluciones en serie de una cantidad conocida de la construcción

de ADN y se incluyó en cada ronda de PCR en tiempo real para la cuantificación de *RASSF1A*, β -*actina* y *SRY* en plasma.

La Figura 11 muestra un ejemplo de cuantificación en PCR en tiempo real de moléculas de *RASSF1A* de plasma materno de 1^o y 3^o trimestre con y sin digestión con *BstU* I- Para la muestra del primer trimestre, la concentración de *RASSF1A* se redujo de 688 copias/ml de plasma a 49 copias/ml de plasma debido a la digestión enzimática. Esta gran reducción es esperable, puesto que la mayoría (promedio de 96,6 %, Lo et al., Am J Hum Genet 1998, 62: 768-775) de las moléculas de ADN son de origen materno y, por lo tanto, están no metiladas y digeridas. Para la muestra del tercer trimestre, la concentración de *RASSF1A* se redujo de 1275 copias/ml de plasma a 74 copias/ml de plasma debido a la digestión enzimática. Los inventores han analizado a 71 mujeres embarazadas (28 en el primer trimestre y 43 en el 3er trimestre) usando este ensayo en moléculas de *RASSF1A*. Las secuencias de *RASSF1A* fueron detectables en todas las muestras de ADN plasmático después de la digestión enzimática sensible a la metilación. Se analizó el control de la digestión de la β -*actina* para todas las muestras. Para cada caso, la secuencia de la β -*actina* se detectó solo sin digestión enzimática.

Ejemplo 4: Demostración de la especificidad fetal de la secuencia de *RASSF1A* en el plasma materno después de la digestión enzimática

La especificidad fetal de las secuencias de ADN después de la digestión enzimática es importante para la aplicación al diagnóstico prenatal y la monitorización del embarazo. En este ejemplo, los inventores demostrarán la especificidad fetal de la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática en el plasma materno mediante cuatro líneas de experimentos.

En el primer experimento, se demuestra que la secuencia de *RASSF1A* no era detectable después de la digestión enzimática en mujeres no embarazadas. Esto es importante ya que si las moléculas de *RASSF1A* después de la digestión enzimática son específicas del feto, no deben detectarse en las mujeres no embarazadas. En la Figura 12, se muestra un caso de mujeres no embarazadas. La secuencia de *RASSF1A* solo se detectó sin digestión enzimática. Con digestión enzimática, no se encontró ninguna secuencia de *RASSF1A* detectable. Como era de esperar, el control de la digestión de β -*actina* solo se detectó sin digestión enzimática. En las 25 voluntarias no embarazadas reclutadas para este estudio, ninguna de ellas mostró señal de *RASSF1A* detectable en el plasma después de la digestión con enzimas de restricción sensibles a la metilación.

En el segundo experimento, se demuestra que la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática no fue detectable después del alumbramiento del bebé. Si las moléculas de *RASSF1A* después de la digestión enzimática son específicas del feto, se espera que desaparezcan del plasma materno ya que las fuentes (siendo la placenta la principal) que liberan dichas moléculas se eliminan después del parto. Se ha demostrado que otros marcadores específicos fetales tales como *SRY* demuestran un aclaramiento similar después del parto (Lo et al., Am J Hum Genet 1998, 62: 768-775). Se recogieron cinco pares de muestras de plasma materno antes y después del parto. En todos los casos, después de la digestión enzimática, las moléculas de *RASSF1A* fueron detectables antes del parto, pero no detectables después del parto (Tabla 1). Del mismo modo, el marcador *SRY* específico del feto solo fue detectable antes del parto.

En el tercer experimento, se usó un marcador de polimorfismo de nucleótido único (SNP) para distinguir las secuencias de *RASSF1A* derivadas de la madre y derivadas del feto. Si las secuencias de *RASSF1A* después de la digestión enzimática son realmente específicas del feto, entonces el genotipo de tales secuencias debería ser el del feto, en lugar del de la madre. Por ejemplo, si un marcador de SNP es CC en el feto y AC en la madre, el genotipo del ADN después de la digestión enzimática debe ser CC, en lugar de AC. De manera similar, para un par AC/CC (fetal/materno), el genotipo del ADN después de la digestión enzimática debe ser AC, en lugar de CC. Para el ADN plasmático sin digestión, el genotipo puede ser el mismo que el de la madre, ya que la mayor parte del ADN plasmático es de origen materno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipado de *RASSF1A*

El ADN se extrajo del plasma materno, la capa leucocitaria materna y la placenta como se ha descrito anteriormente. Treinta y cinco microlitros de cada muestra de ADN de plasma materno se sometieron a digestión con la enzima *BstU* I durante 16 horas como se ha descrito anteriormente. La amplificación por PCR de la secuencia de *RASSF1A* se realizó con los cebadores RSF-b151F, 5'-AGCCTGAGCTCATTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:27) y RSF-dsgnR, 5'-ACCAGCTGCCGTGTGG-3' (SEQ ID NO:28) usando como moldes ADN de la capa leucocitaria materna, ADN de la placenta, ADN de plasma materno sin digestión enzimática y ADN de plasma materno después de digestión enzimática. Dado que existe un polimorfismo de nucleótido único (SNP id: rs4688725) dentro de este amplicón *RASSF1A*, pueden determinarse los genotipos de *RASSF1A* de diferentes tejidos. Se estableció una reacción de extensión de cebador para el genotipado del ADN de *RASSF1A*. Cada reacción de 14 μ l contenía 10 μ l de productos de PCR, cebador de extensión 0,77 μ M Rsf-R17 5'-CAGCCGGGTGGCCCT-3' (SEQ ID NO:36), 1,15 U de termosecuencia y una mezcla de dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP y ddTTP) y el desoxinucleótido GTP (64

5 μM de cada uno). Para la secuencia de *RASSF1A* con un genotipo A, el cebador se extendería para producir 5'-CAGCCGGGTGGGCCCTddT-3' (SEQ ID NO:37) con un peso molecular de 5476,6 Da. Para la secuencia de *RASSF1A* con un genotipo C, el cebador se extendería para producir 5'-5'-CAGCCGGGTGGGCCCTGddC-3' (SEQ ID NO: 38) con un peso molecular de 5790,8 Da. Los productos de extensión base finales se analizaron mediante espectrometría de masas MassARRAY MALDI-TOF (SEQUENOM). El genotipo del *RASSF1A* fue determinado por el software TyperAnalyzer (SEQUENOM).

10 La Figura 13 muestra un ejemplo del resultado del experimento de genotipado para el ADN de plasma materno con o sin digestión enzimática, ADN de la capa leucocitaria materna y ADN de la placenta. Como era de esperar, el genotipo del ADN de plasma materno después de la digestión enzimática fue el mismo que el de la placenta (genotipo fetal), pero no que el de la capa leucocitaria materna. En la Tabla 2 se muestran los resultados de genotipado para 43 casos en los que se analizó el ADN de plasma materno con o sin digestión enzimática, el ADN de la capa leucocitaria materna y el ADN de placenta. cada uno de los 43 casos, el genotipo del ADN de plasma materno tras la digestión enzimática fue idéntico al genotipo del de la placenta (fetal).

15 En el cuarto experimento, se demostró que dos marcadores, a saber, la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática y la secuencia de *SRY*, tenían concentraciones en el plasma materno que se correlacionaban entre sí. El ADN plasmático se extrajo de 24 mujeres embarazadas en el tercer trimestre que llevaban un solo feto masculino. Como se muestra en la Figura 14, se observó una correlación positiva entre la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática y la secuencia de *SRY* ($r = 0,717$, $p < 0,0001$, correlación de Spearman). Además, la concentración de *RASSF1A* total sin digestión enzimática, derivada predominantemente de la madre, no se correlacionó con la de *SRY*.

20 Estos cuatro experimentos demostraron, de manera concluyente, que la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática era exclusivamente (en la medida de las técnicas que usamos) de origen fetal. Por tanto, *RASSF1A* es útil para el diagnóstico prenatal y la monitorización del embarazo.

30 **Ejemplo 5: Demostración de *RASSF1A* como un marcador analítico positivo para el diagnóstico prenatal del tipo sanguíneo RhD**

35 La incompatibilidad del grupo sanguíneo Rhesus D (RhD) es una causa importante de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. La patogénesis de este trastorno implica la aloinmunización de una mujer embarazada RhD negativa por el antígeno de RhD codificado por el alelo paterno y se muestra en la superficie de los glóbulos rojos fetales. La aloinmunización materna generalmente se produce durante el parto, cuando el tejido de un feto RhD positivo entra en contacto con la sangre materna. Esto generaría anticuerpos anti-RhD que pueden atravesar la placenta y destruir los glóbulos rojos fetales en los embarazos posteriores con un feto RhD positivo. La aloinmunización materna se puede prevenir o minimizar administrando inmunoglobulina profiláctica anti-RhD antes y después del parto del primer bebé RhD positivo. Por lo tanto, es beneficioso conocer el estado RhD de un feto antes del parto. Sin embargo, la obtención de células fetales para el genotipado/fenotipado del RhD por amniocentesis conlleva un riesgo de hemorragia transplacentaria, que, si el feto es RhD positivo, podría sensibilizar la producción materna de anti-RhD. El desarrollo de genotipado prenatal del RhD no invasivo ofrece una alternativa segura a la obtención de células fetales para el genotipado del RhD (Lo et al., N Engl J Med 1998; 339: 1734-1738). Esta técnica implica la detección de la secuencia fetal de RhD en el plasma materno. La presencia de la secuencia RhD en el plasma de una mujer embarazada RhD negativa indicaría un feto RhD positivo. Sin embargo, la ausencia de dicha secuencia en el plasma materno se puede interpretar de dos maneras: 1) el feto es RhD negativo; o 2) hay insuficiente ADN fetal en el plasma materno para permitir la tipificación exacta del RhD fetal. Un marcador de ADN fetal universal como control positivo en el ADN del plasma materno sería útil para excluir la segunda posibilidad. La detección del marcador de ADN fetal de control positivo en el ADN de plasma materno apoyaría la presencia de un feto RhD negativo, mientras que la ausencia del marcador fetal de ADN sugeriría ADN fetal inadecuado en el plasma materno. Hasta la fecha, los marcadores de ADN fetal disponibles que se pueden usar como control positivo incluyen ADN de cromosoma Y y polimorfismos de ADN. Ambos tipos de marcadores solo son aplicables a un subconjunto de embarazos. El ADN de cromosoma Y solo es aplicable a los embarazos con un feto masculino. El polimorfismo del ADN solo es aplicable a determinadas combinaciones de genotipos en las que cierto genotipo está presente solo en el feto, pero no en la mujer embarazada. A este respecto, la secuencia de *RASSF1A* metilada ilustrada en las secciones anteriores podría usarse como un marcador de ADN fetal universal que es aplicable a todos los embarazos independientemente del sexo o polimorfismo del feto. Los expertos en la técnica también reconocerán que, además del marcador *RASSF1A* metilado, los otros marcadores descritos en el presente documento también podrían usarse de esta manera.

60 La Figura 15 muestra un diagrama esquemático que describe una estrategia para la tipificación no invasiva del RhD del feto. Esta no es de ninguna manera la única manera que un marcador de ADN fetal hipermetilado puede usarse como un marcador analítico positivo para el diagnóstico prenatal de tipo de sangre RhD. Los expertos en la técnica también pueden apreciar que un marcador de ADN fetal hipermetilado, tal como *RASSF1A* puede usarse como marcador analítico positivo para el diagnóstico prenatal de otras afecciones tales como β -talasemia, fibrosis quística, hiperplasia suprarrenal congénita y aneuploidias cromosómicas. Este marcador analítico positivo también puede evaluarse antes o simultáneamente con la evaluación prenatal real de una afección, tal como el tipo de sangre RhD.

MATERIALES Y MÉTODOS**Reclutamiento sujetos y recolección de muestras**

5 Se reclutaron sujetos que se estaban realizando en el primer trimestre el cribado de detección de síndrome de Down del King's College Hospital de Londres, Reino Unido. El estudio y la recolección de muestras clínicas humanas fueron aprobados por la junta de revisión institucional. Se solicitó el consentimiento informado de cada sujeto. Los tejidos de las vellosidades coriónicas se recogieron a través de un procedimiento de muestreo de vellosidades coriónicas. Se recogieron muestras de sangre periférica materna justo antes de la realización de procedimientos
10 obstétricos.

Procesamiento de muestras y detección en PCR en tiempo real para secuencias RHD

15 Se extrajo ADN de muestras de plasma materno, capa leucocitaria y CVS como se ha descrito en las secciones anteriores. El estado RhD de la madre y del feto se determinó mediante amplificación en tiempo real de una secuencia en el exón 7 y en el exón 10 del gen *RHD* como se ha descrito en anteriormente (Lo et al., N Engl J Med 1998, 339: 1734-1738; Rijnders et al., Obstet Gynecol 2004, 103:157-164) utilizando ADN de la capa leucocitaria materna y ADN de las CVS como moldes, respectivamente. En nuestra cohorte, los ensayos con el exón 7 y el exón 20 10 dieron resultados idénticos para todos los sujetos estudiados. La detectabilidad de la secuencia de *RHD* en el plasma materno se determinó por los mismos sistemas de PCR en tiempo real usando 5 µl de ADN plasmático como moldes. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Una muestra se calificaría como positiva si cualquiera de los duplicados fuera positivo. La presencia de ADN fetal en el plasma materno se confirmó mediante la amplificación de la secuencia de *SRY* (para fetos masculinos) y la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática del ADN de plasma materno. La PCR en tiempo real dirigida al gen *SRY* se llevó a cabo utilizando ADN de plasma sin digestión enzimática como los moldes. Las PCR en tiempo real para las secuencias de *RASSF1A* y β-actina se llevaron a cabo utilizando el ADN de plasma materno después de la digestión enzimática como los moldes.
25

RESULTADOS

30 Se examinó el estado RhD de 355 mujeres embarazadas. Cincuenta y cuatro de ellas eran RHD negativo. Como este grupo de sujetos estaban en riesgo de aloinmunización por un feto RhD positivo, se realizó su plasma y CVS a una investigación adicional para el estado fetal de RhD. Las secuencias de *RHD* se detectaron en el ADN materno de 35 sujetos y fueron negativos en el plasma materno de 19 sujetos. En 15 de los 19 sujetos con resultado RHD negativo en plasma materno se detectaron secuencias de *RASSF1A* en el ADN plasmático tras digestión enzimática. 35 Los otros 4 casos fueron negativos para *RASSF1A* después de la digestión enzimática. La señal de Beta-actina fue negativa en todos los casos, lo que indica que la digestión con la enzima *BstU I* fue completa en los 19 casos. Según el análisis de las muestras de CVS, los 15 sujetos con detección positiva de *RASSF1A* después de la digestión enzimática llevaban un feto RhD-negativo. En los 4 sujetos que mostraron una detección negativa de *RHD* y *RASSF1A* en su plasma, CVS fue RHD positivo en 2 de ellos. Por lo tanto, para estos dos casos, el genotipado de 40 RHD en plasma materna había producido resultados falsos negativos, que se escogieron según el fallo en la detección del marcador analítico positivo *RASSF1A* después de la digestión enzimática. Para ilustrar la importancia de este marcador fetal independiente del sexo, estos resultados se compararon con un marcador de ADN fetal existente *SRY*. El ensayo de *SRY* sería positivo solo cuando el feto es masculino. Para los 19 sujetos con detección negativa de la secuencia de *RHD* en su plasma, 6 de ellos fueron positivos para *SRY*, indicando la presencia de 45 ADN fetal amplificable en la muestra de plasma materno analizado y confirmando así la naturaleza genuina del estado RhD negativo del feto. En los 13 casos restantes, si la detección negativa de las secuencias de *RHD* y *SRY* en el ADN plasmático es el resultado de un feto RhD negativo femenino o el ADN fetal inadecuado en el plasma materno no puede determinarse sin utilizar el protocolo *RASSF1A* como control positivo para ADN fetal.

Ejemplo 6: Demostración de *RASSF1A* como un marcador independiente del sexo para el control de la preeclampsia

La utilidad clínica de los marcadores de ADN fetal hipermetilados va más allá de servir como un marcador analítico positivo. La detección y/o cuantificación del *RASSF1A* por sí misma después de la digestión enzimática puede ser 55 útil en el diagnóstico prenatal y la monitorización del embarazo. En otras palabras, estas secuencias de ADN fetal hipermetiladas en el plasma materno pueden servir como biomarcadores por su propio derecho. Anteriormente, se ha demostrado que la concentración de ADN fetal en el plasma materno se incrementa en ciertas afecciones, como la preeclampsia y las aneuploidías fetales. Sin embargo, debido a la falta de un marcador de ADN fetal independiente del sexo, los estudios previos estaban limitados a mujeres embarazadas que llevaban un feto masculino (Levine et al., Am J Obstet Gynecol 190:707-713; Leung et al., Clin Chem 47:147-139). En este ejemplo, se compararon las concentraciones de ADN fetal en el plasma, dirigiéndose a la secuencia de *RASSF1A* después de la digestión enzimática, de 5 mujeres con preeclampsia con 5 embarazadas de edad gestacional equivalente sin ninguna complicación asociada con el embarazo. Las concentraciones de *RASSF1A* medidas en las muestras de ADN del plasma materno después de la digestión enzimática de los dos grupos se muestran en la Figura 16. La mediana de las concentraciones de las mujeres embarazadas con y sin preeclampsia fueron 9.400 copias/ml y 2.200 copias/ml de plasma, respectivamente. La diferencia entre los dos grupos fue estadísticamente significativa ($p =$
65

0,016, prueba de Mann-Whitney).

5 **Tabla 1** Aclaramiento de las secuencias de *RASSF1A* y *SRY* del plasma materno después del parto. Se tomó sangre de 5 mujeres embarazadas que llevaban un feto masculino justo antes del parto y 24 horas después del parto. Después de que las muestras de ADN de plasma materno se trataran con enzima sensible a la metilación, se detectaron secuencias de *RASSF1A* y *SRY* en el plasma de todos los sujetos antes del parto, pero no se detectaron en ninguna de las muestras de plasma 24 horas después del parto.

Sujetos	Después de la digestión enzimática, concentraciones plasmáticas de (copias/ml)			
	<i>RASSF1A</i>		<i>SRY</i>	
	Antes del parto	24 horas después del parto	Antes del parto	24 horas después del parto
A	84	0	27	0
B	49	0	13	0
C	42	0	15	0
D	23	0	11	0
E	19	0	9	0

10 **Tabla 2** Los genotipos *RASSF1A* del ADN de la capa leucocitaria materna, ADN placentario y ADN del plasma materno con o sin digestión enzimática de 43 mujeres embarazadas. En cada uno de los 43 casos, el genotipo del ADN del plasma materno con digestión enzimática fue idéntico al genotipo de la placenta (fetal), lo que sugiere que solo las moléculas de ADN fetales específicas fueron amplificables después de la digestión enzimática de las muestras de ADN del plasma materno.

Caso	Genotipo de <i>RASSF1A</i>			
	<i>ADN de capa leucocitaria materna</i>	<i>ADN de plasma materno sin digestión</i>	<i>ADN de la placenta</i>	<i>ADN de plasma materno con digestión</i>
616	CC	CC	CC	CC
677	AC	AC	AC	AC
688	AC	AC	CC	CC
695	CC	CC	CC	CC
832	AC	AC	CC	CC
849	AC	AC	CC	CC
873	AC	AC	AC	AC
920	AC	AC	AC	AC
928	AA	AA	AC	AC
1082	CC	CC	CC	CC
1088	AC	AC	CC	CC
1089	AA	AA	AC	AC
1112	CC	CC	CC	CC
1114	AA	AA	AA	AA
1145	AA	AA	AA	AA
1148	AC	AC	AC	AC
1149	CC	CC	CC	CC
1155	AA	AA	AA	AA
1157	CC	CC	CC	CC
1158	AC	AC	AA	AA
1170	CC	CC	CC	CC
1171	AC	AC	CC	CC
1172	AC	AC	AC	AC
1182	CC	CC	CC	CC
1185	AC	AC	AC	AC
1186	AC	AC	AA	AA
1192	AC	AC	AA	AA
1194	AC	AC	AC	AC
1195	CC	CC	CC	CC
1197	CC	CC	AC	AC
1200	AC	AC	AC	AC
1203	AA	AA	AA	AA
1204	AA	AA	AC	AC
1210	AC	AC	AC	AC
1211	CC	CC	AC	AC
1212	AC	AC	AC	AC
1213	AC	AC	CC	CC
1214	AC	AC	CC	CC

ES 2 608 954 T3

<210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligo de PCR específico de metilación dominio de asociación con Ras (Ra1GDS/AF-6) familia 1 (RASSF1A) RASSF1A-UR cebador inverso
 10
 <400> 4
 caaacccac aaactaaaa caa 23
 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Dominio de asociación con Ras (Ra1GDS/AF-6) familia 1 (RASSF1A) oligo de secuenciación de bisulfito HsPromotor-F cebador directo
 20
 <400> 5
 gggtttata gttttgtat ttaggtttt 30
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Dominio de asociación con Ras (Ra1GDS/AF-6) familia 1 (RASSF1A) oligo de secuenciación de bisulfito HsPromotor-R cebador inverso
 30
 <400> 6
 caactcaata aactcaaact ccccc 25
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Dominio de asociación con Ras (Ra1GDS/AF-6) familia 1 (RASSF1A) oligo de secuenciación de bisulfito HsExonI-F cebador directo
 45
 <400> 7
 ggggagtttg agtttattga gttg 24
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Dominio de asociación con Ras (Ra1GDS/AF-6) familia 1 (RASSF1A) oligo de secuenciación de bisulfito HsExonI-R cebador inverso
 55
 <400> 8
 ctaccctta actaccctt cc 22
 <210> 9
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 65

ES 2 608 954 T3

	<223> adenomatosis poliposis coli (APC) oligo de secuenciación de bisulfito HsPromotor-F cebador directo	
5	<400> 9 taatttattt aatattattg ttttttggg ttgt	34
	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> adenomatosis poliposis coli (APC) oligo de secuenciación de bisulfito HsPromotor-R cebador inverso	
15	<400> 10 caccctaacr aactacacca atacaa	26
	<210> 11 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> receptor de ácido retinoico, beta (RARB) oligo de secuenciación de bisulfito HsRARBPromotor-F cebador directo	
25	<400> 11 gtaggyggaa tatygtttt taagttaagt	30
30	<210> 12 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> receptor de ácido retinoico, beta (RARB) oligo de secuenciación de bisulfito HsRARBPromotor-R cebador inverso	
40	<400> 12 acttctact acttctatca cacaaaataa aa	32
45	<210> 13 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> receptor de ácido retinoico, beta (RARB) oligo de secuenciación de bisulfito HsRARBExonI-F cebador directo	
55	<400> 13 ttttatttg tgtgatagaa gtagtaggaa gt	32
	<210> 14 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> receptor de ácido retinoico, beta (RARB) oligo de secuenciación de bisulfito HsRARBExoM-R cebador inverso	
65	<400> 14 aatcatttac catttccaa acttactc	28
	<210> 15	

ES 2 608 954 T3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> oligo de PCR específico de metilación caspasa 8, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis (CASP8) CASP8-MF cebador directo

10

<400> 15
 ggtagggga ttcggagatt gc 22

<210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> oligo de PCR específico de metilación caspasa 8, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis (CASP8) CASP8-MR cebador inverso

20

<400> 16
 aaaaaaacgg tatatctaca ttcgaaacg 29

25

<210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> caspasa 8, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis (CASP8) oligo de secuenciación de bisulfito HsExonI-F cebador directo

35

<400> 17
 agggaagtgt tttataggt tttt 25

40

<210> 18
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> caspasa 8, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis (CASP8) oligo de secuenciación de bisulfito HsExonI-R cebador inverso

50

<400> 18
 ataatttct attaaaaaaaa ccacctaa 29

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> oligo de PCR específico de metilación secretoglobulina, familia 3A, miembro 1 (SCGB3A1) SCGB3A1-MF cebador directo

60

<400> 19
 tttagtttg tagggggcg c 21

<210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65

ES 2 608 954 T3

	<220> <223> oligo de PCR específico de metilación secretoglobulina, familia 3A, miembro 1 (SCGB3A1) SCGB3A1-MF cebador directo	
5	<400> 20 accaactcc tactacgacc gacg	24
10	<210> 21 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> secretoglobulina, familia 3A, miembro 1 (SCGB3A1) oligo de secuenciación de bisulfito HsPromotor-F cebador directo	
20	<400> 21 gattagaggt agggattagg gagtt	25
25	<210> 22 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> secretoglobulina, familia 3A, miembro 1 (SCGB3A1) oligo de secuenciación de bisulfito HsPromotor-R cebador inverso	
35	<400> 22 taacaaacrc taaaccctc taaa	24
40	<210> 23 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligo de PCR específico de metilación proteína de interacción con DOC-2/DAB2 (DAB2IP) DAB2IP-MF cebador directo	
50	<400> 23 gtaagggtgc gggtttcgc	19
55	<210> 24 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligo de PCR específico de metilación proteína de interacción con DOC-2/DAB2 (DAB2IP) DAB2IP-MR cebador inverso	
65	<400> 24 gaactcacct ctattatcc gcg	23
70	<210> 25 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
75	<220> <223> proteína de interacción con DOC-2/DAB2 (DAB2IP) oligo de secuenciación de bisulfito HsExonI-F cebador directo	
80	<400> 25 aagggttta ttaagygtat taagagtt	28

ES 2 608 954 T3

<210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5

<220>
 <223> proteína de interacción con DOC-2/DAB2 (DAB2IP) oligo de secuenciación de bisulfito HsExonl-R cebador inverso

10 <400> 26
 accccraaaa aaaacacaaa 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> RASSF1A cebador directo de PCR en tiempo real RSF-b151F
 20

<400> 27
 agcctgagct cattgagctg 20

<210> 28
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25

<220>
 <223> RASSF1A cebador inverso de PCR en tiempo real RSF-dsgnR
 30

<400> 28
 accagctgcc gtgtgg 16

<210> 29
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <223> RASSF1A sonda fluorescente de unión al surco menor (MGB) de PCR en tiempo real RSF-dsgnT
 40

<221> modified_base
 <222> (1) ... (1)
 <223> n = c modificado por FAM
 45

<221> modified_base
 <222> (16) ... (16)
 <223> n = t modificado por molécula de unión al surco menor (MGB)
 50

<400> 29
 ncaacgcgct gcgcan 16

<210> 30
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> beta-actina cebador directo de PCR en tiempo real Actin-163F
 60

<400> 30
 gcgcccgtcc gaaagtt 17

<210> 31
 <211> 15
 65

ES 2 608 954 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> beta-actina cebador inverso de PCR en tiempo real Actin-298R

<400> 31
 cggcggatcg gcaaa 15

10

<210> 32
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> beta-actina sonda fluorescente de unión al surco menor (MGB) de PCR en tiempo real Actin-243T

20

<221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> n = a modificado por VIC

25

<221> modified_base
 <222> (17)...(17)
 <223> n = c modificado por molécula de unión al surco menor (MGB)

<400> 32
 nccgccgaga ccgcgtn 17

30

<210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Región determinante del sexo Y del cromosoma Y (SRY) cebador de amplificación directo de PCR en tiempo real SRY-109F

40

<400> 33
 tggcgattaa gtcaaattcg c 21

45

<210> 34
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Región determinante del sexo Y del cromosoma Y (SRY) cebador de amplificación inverso de PCR en tiempo real SRY-245R

<400> 34
 ccccctagta ccctgacaat gtatt 25

55

<210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Región determinante del sexo Y del cromosoma Y (SRY) sonda fluorescente de unión al surco menor (MGB) de PCR en tiempo real SRY-142T

65

<221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> n = a modificado por FAM

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de ADN fetal en una muestra biológica de sangre entera, de plasma o de suero de una mujer embarazada, que comprende las etapas de:
- 5 (a) tratar la muestra con un agente que modifica diferencialmente el ADN metilado y el no metilado; y
 (b) detectar la secuencia de ADN metilado de *RASSF1A* en la muestra, en donde la presencia de la secuencia de ADN metilado indica la presencia de ADN fetal en la muestra y la ausencia de la secuencia de ADN metilado indica la ausencia de ADN fetal en la muestra.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) determina la cantidad de la secuencia de ADN.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) indica la presencia de ADN fetal en la muestra, comprendiendo adicionalmente el método las etapas de:
- 15 (c) determinar la cantidad de una segunda secuencia de ADN fetal en una segunda muestra, en donde la segunda muestra es idéntica a la muestra de la etapa (a) antes de tratarla con el agente y la segunda secuencia no es *RASSF1A*; y
 (d) comparar la cantidad de la segunda secuencia con un control estándar, en donde un aumento en la cantidad de la segunda secuencia con respecto al control indica la presencia o un riesgo aumentado de desarrollar una afección asociada al embarazo.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que la segunda muestra de la etapa (c) se trata con el agente antes de determinar la cantidad de la segunda secuencia de ADN fetal.
- 25 5. El método de la reivindicación 3, en el que la segunda muestra en la etapa (c) se trata con un segundo agente diferente que modifica diferencialmente el ADN metilado y el no metilado antes de determinar la cantidad de la segunda secuencia de ADN fetal.
- 30 6. El método de la reivindicación 3, en el que la afección asociada al embarazo es preeclampsia, parto prematuro o retraso del crecimiento intrauterino (RCIU).
7. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) indica la presencia de ADN fetal en la muestra, comprendiendo adicionalmente el método la etapa de:
- 35 (c) detectar una segunda secuencia de ADN fetal en una segunda muestra, en donde la segunda muestra es idéntica a la muestra de la etapa (a) antes de ser tratada con el agente y la segunda secuencia es un gen de un tipo sanguíneo RhD, un gen de tipo sanguíneo ABO, un gen de tipo sanguíneo RhC, un gen de tipo sanguíneo RhE, un gen de tipo HLA o un gen localizado en el cromosoma Y, o un gen que contiene una mutación predeterminada, en donde la presencia de la segunda secuencia indica la presencia del tipo sanguíneo RhD, del tipo sanguíneo ABO, del tipo sanguíneo RhC, del tipo sanguíneo RhE, del tipo de HLA, del cromosoma Y o de la mutación en el genoma fetal.
- 40 8. El método de la reivindicación 3 o la reivindicación 7, en el que la segunda muestra en la etapa (c) no se trata con ningún agente que modifique diferencialmente el ADN metilado y el no metilado.
- 45 9. Un método para detectar una afección asociada al embarazo en una mujer embarazada, que comprende las etapas de:
- 50 (a) tratar una muestra biológica de sangre entera, de plasma o de suero obtenida de la mujer con un agente que modifique diferencialmente el ADN metilado y el no metilado;
 (b) detectar la secuencia de ADN metilado de *RASSF1A* en la muestra y, cuando está presente, detectar la cantidad de la misma; y
 (c) comparar la cantidad de la segunda secuencia de ADN metilado con un control estándar, en donde un aumento con respecto al control indica la presencia o un riesgo aumentado de desarrollar una afección asociada al embarazo.
- 55 10. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 9, en el que (I) el agente digiere el ADN no metilado, pero no el ADN metilado, en donde el agente es opcionalmente una enzima sensible a la metilación, además opcionalmente una enzima de restricción sensible a la metilación, aún más opcionalmente *Hpa* II o *Bst*U I; o (II) el agente comprende bisulfito.
- 60 11. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 9, en el que la etapa (b) comprende un proceso de amplificación, o el método de la reivindicación 7, en el que la etapa (c) comprende un proceso de amplificación.
- 65

12. El método de la reivindicación 11, en el que el proceso de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

13. 13. El método de la reivindicación 12, en el que la PCR es PCR en tiempo real.

5

14. El método de la reivindicación 9, en el que la afección asociada al embarazo es preeclampsia, parto prematuro o retraso del crecimiento intrauterino (RCIU).

FIGURA 1

Oligo PCR específica de metilación	Secuencia (5' a 3')	Longitud del producto (pb)	Cita (si hay)
RASSF1A-MF	GTGTTAACGGCTTGGGTATC	82	Lo, K. W. et al. <i>Cancer Res</i> 61, 3877-81 (2001).
RASSF1A-MR	AACCCCGCGAACTAAAACGA		
RASSF1A-UF	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	94	
RASSF1A-UR	CAAACCCCAAACTAAAACAA		

Secuenciación por bisulfito (ser humano)

RASSF1A			
HsPromotor-F	GGGTTTATAGTTTTGTATTTAGGTTTT	201	
HsPromotor-R	CAACTCAATAAACTCAAACCTCCCC		
HsExón1-F	GGGGAGTTTGAGTTTATTGAGTTG	297	
HsExón1-R	CTACCCCTTAACCTACCCCTTCC		
APC			
HsPromotor-F	TAAATTTATTAATATTGTTTTTTGTGTTGT	414	
HsPromotor-R	CACCCTAACRAACTACACCAATACAA		
RARB			
HsRARBPromotor-F	GTAGGYGGAATATYGTTTTTAAGTTAAGT	378	
HsRAREPromotor-R	ACTTCTACTACTTCTATCACACAAAATAAAA		
HsRARBExón1-F	TTTTATTTGTGTGATAGAAGTAGTAGGAAGT	290	
HsRARBExón1-R	AATCATTTACCATTTCCAACTTACTC		

Notas sobre el sufijo oligo, prefijo y sufijo de la secuencia:

F Cebador directo
R Cebador inverso

Condiciones de reacción y perfil térmico para la PCR por bisulfito del promotor de RASSF1A y exón 1

	Final			
10X Tampón II	1X	95°C	10 min	} x 40 ciclos
MgCl ₂	3,0mM	95°C	40 s	
dNTP	200µM	57°C	45 s	
Cebador directo	200nM	72°C	45 s	
Cebador inverso	200nM	72°C	7 min	
AmpliTaQ Gold	1U			
ADN convertido por bisulfito	80ng			
Volumen total de la reacción	25 µl			

Condiciones de reacción y perfil térmico para la PCR por bisulfito del promotor de APC humano

	Final			
10X Tampón II	1X	95°C	10 min	} x 45 ciclos
MgCl ₂	3,0mM	95°C	40 s	
dNTP	300µM	57°C	1 min	
Cebador directo	400nM	72°C	40 s	
Cebador inverso	400nM	72°C	7 min	
AmpliTaQ Gold	1U			
ADN convertido por bisulfito	120ng			
ADN convertido por bisulfito	25 µl			

Condiciones de reacción y perfil térmico para la PCR por bisulfito del promotor de RARB humano y exón 1

	Final conc.			
10X Tampón II	1X	95°C	10 min	} x 40 ciclos
MgCl ₂	3,0mM	95°C	40 s	
dNTP	200µM	57°C	1 min	
Cebador directo	200nM	72°C	40 s	
Cebador inverso	200nM	72°C	7 min	
AmpliTaQ Gold	1U			
ADN convertido por bisulfito	80ng			
ADN convertido por bisulfito	25 µl			

Figura 2B

Sitios CpG en el promotor de de RASSF1A Sitios CpG en el exón 1 de RASSF1A

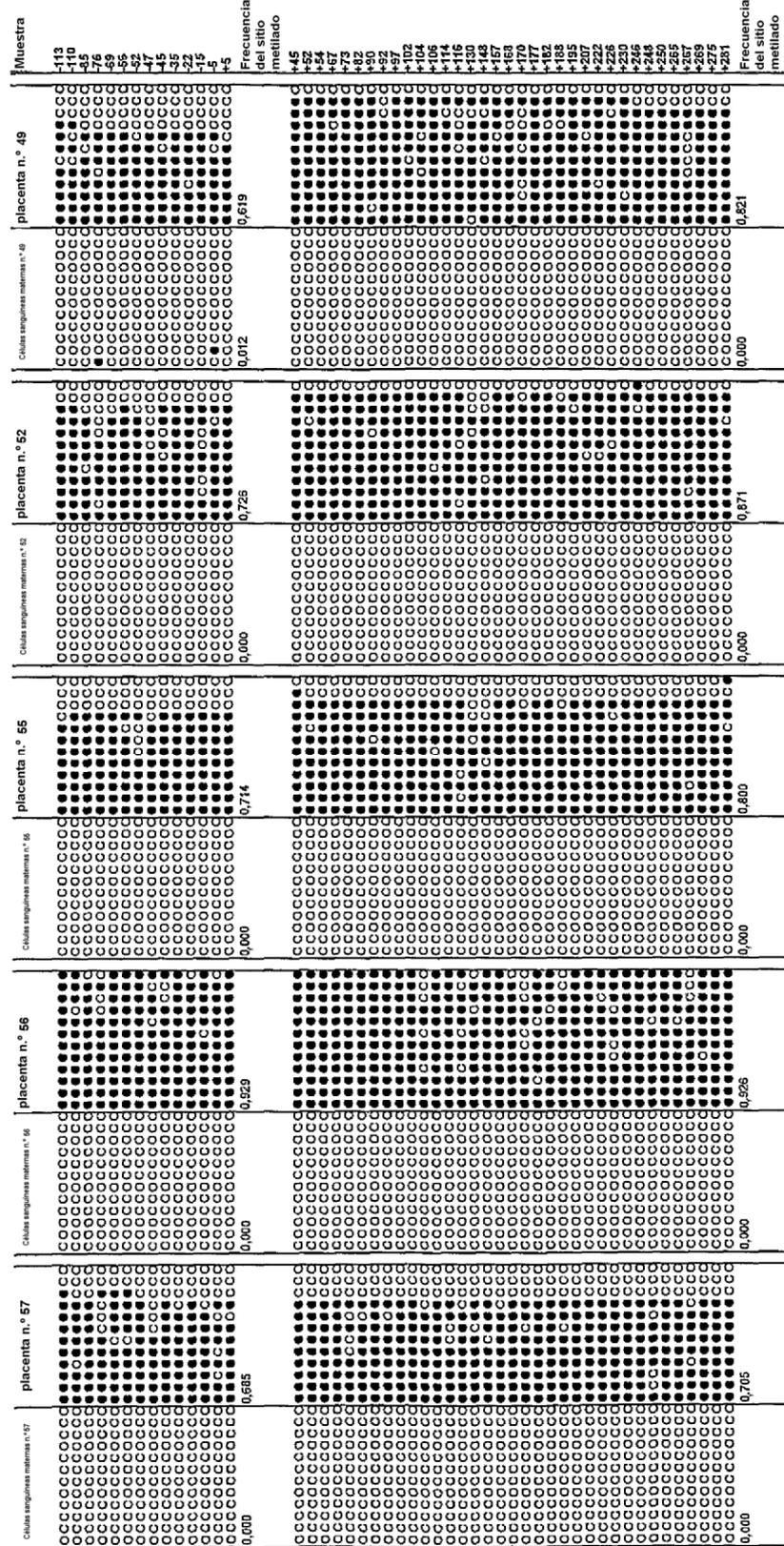


Figura 3 Parte 1

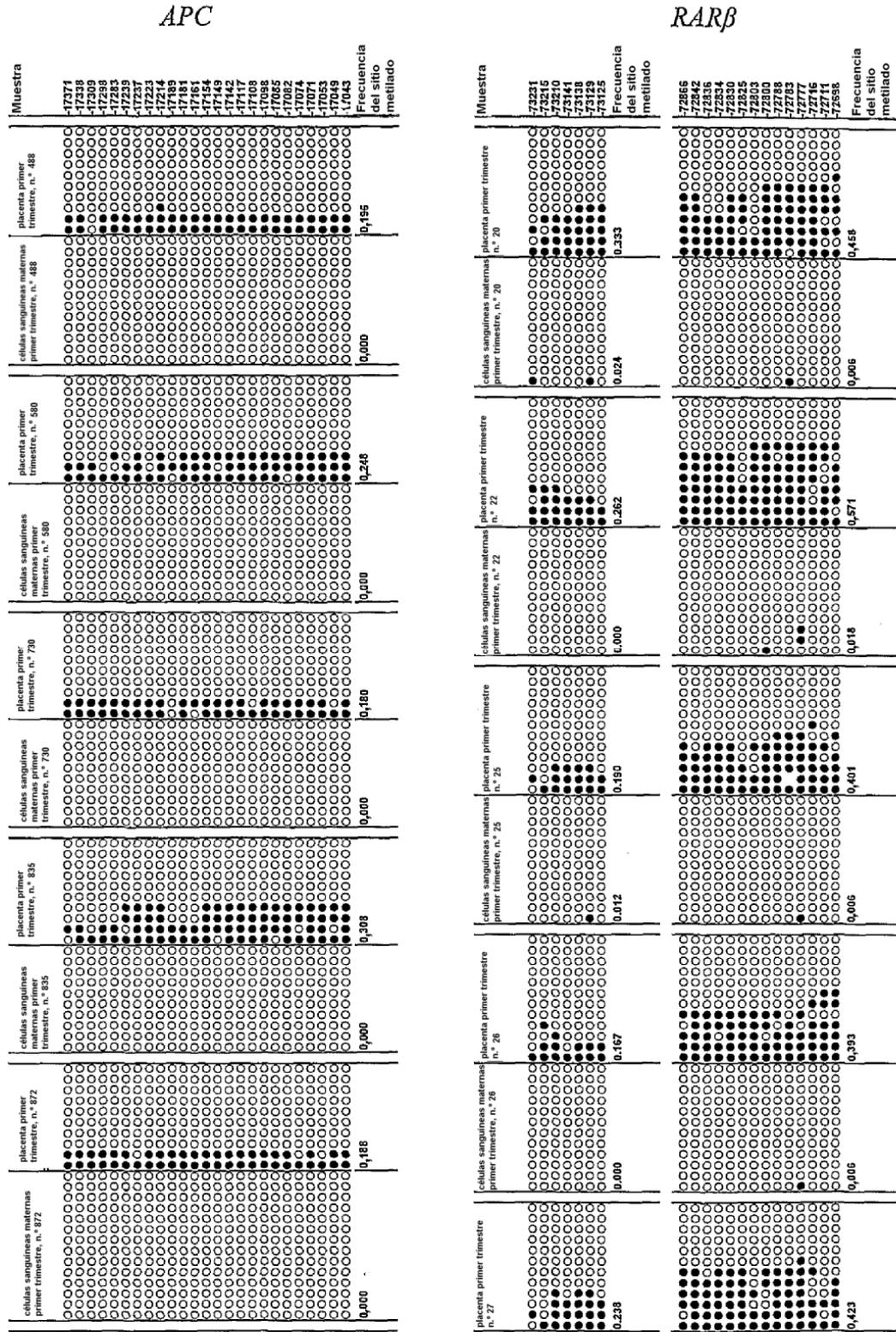


Figura 3 Parte 2

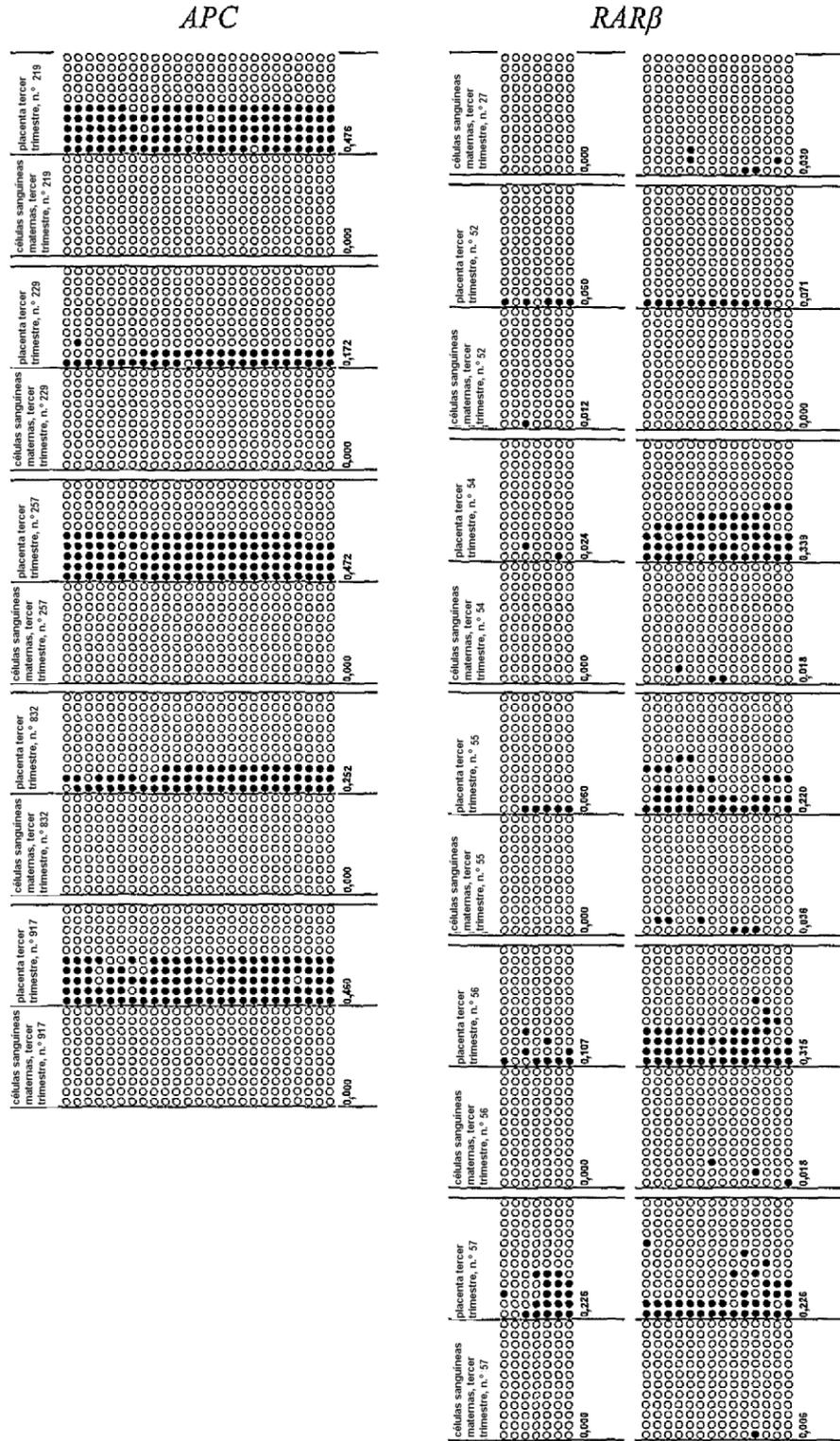


Figura 5

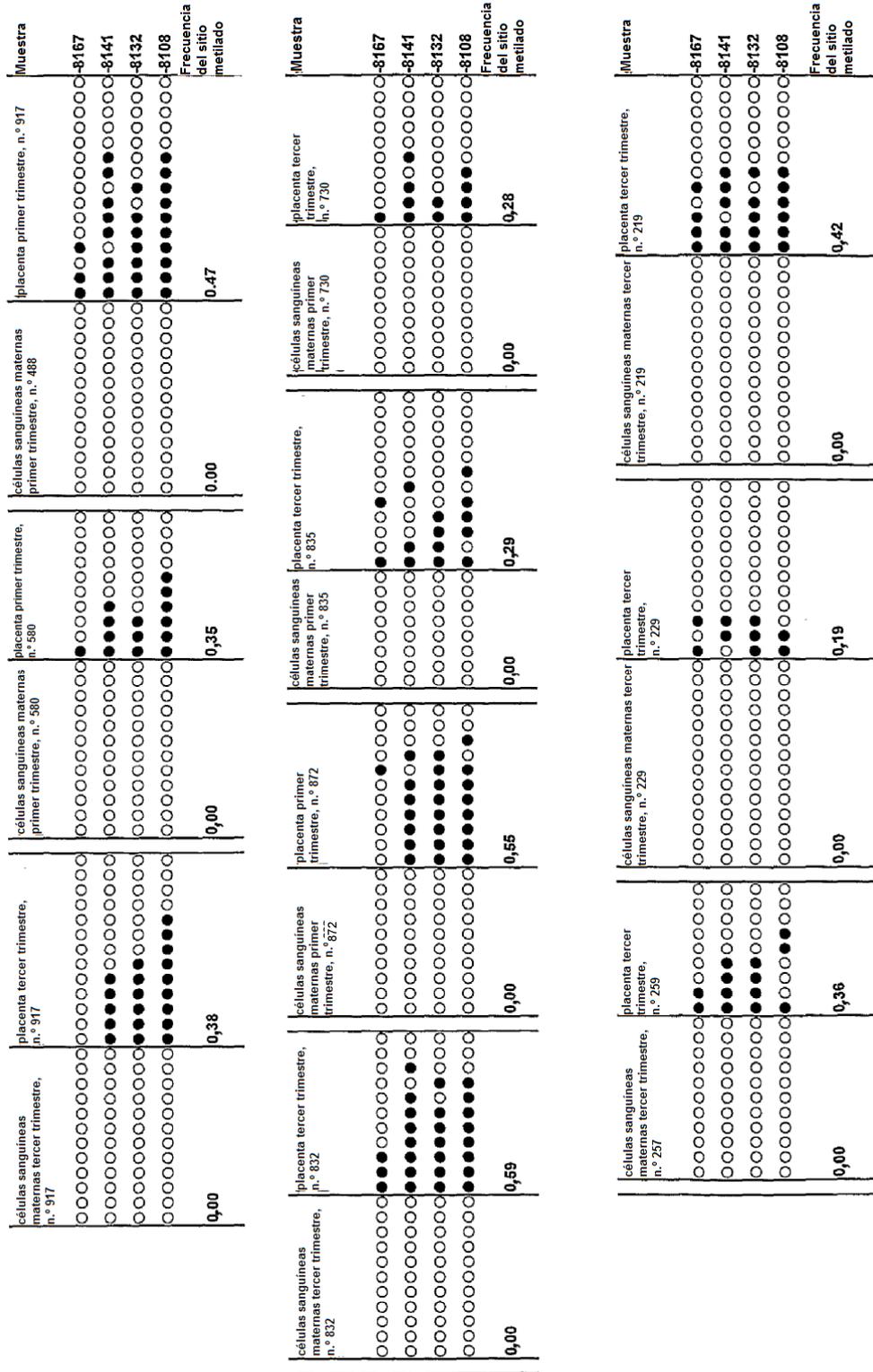


Figura 7

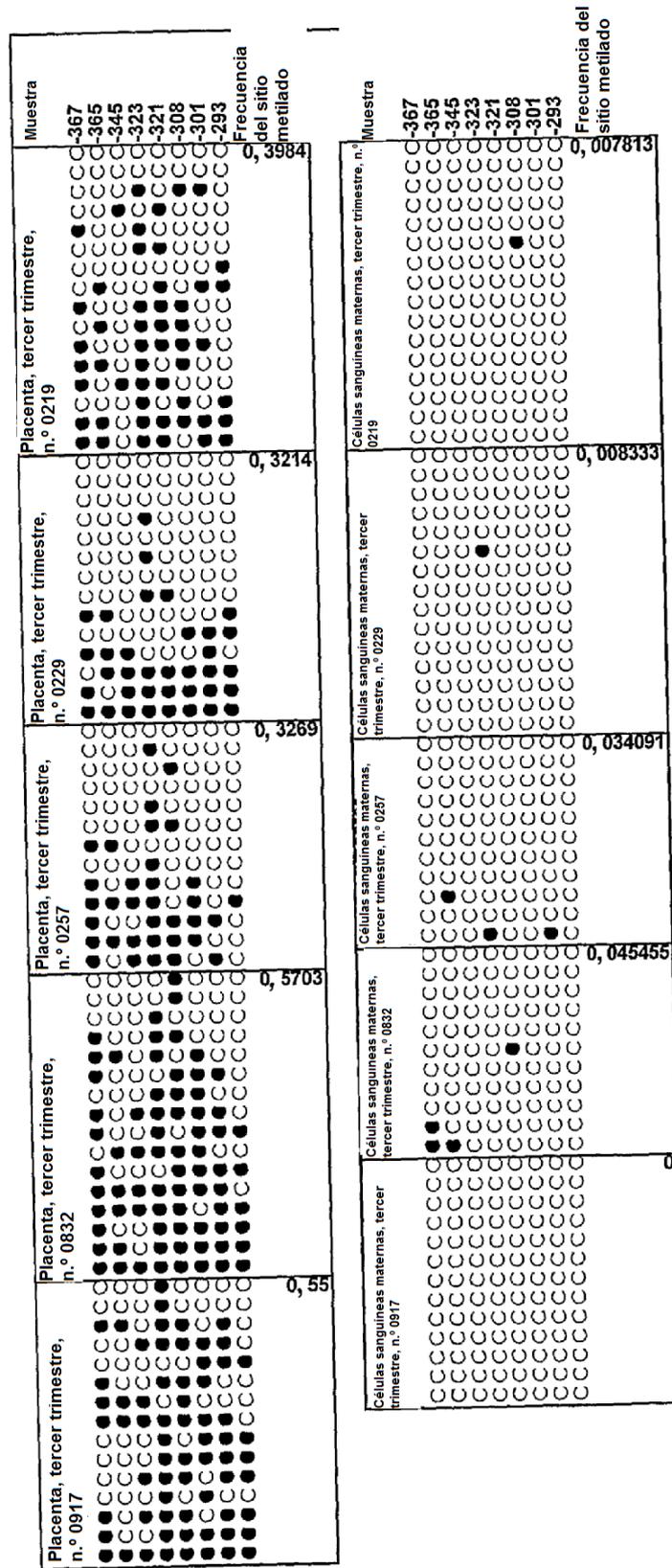


Figura 8

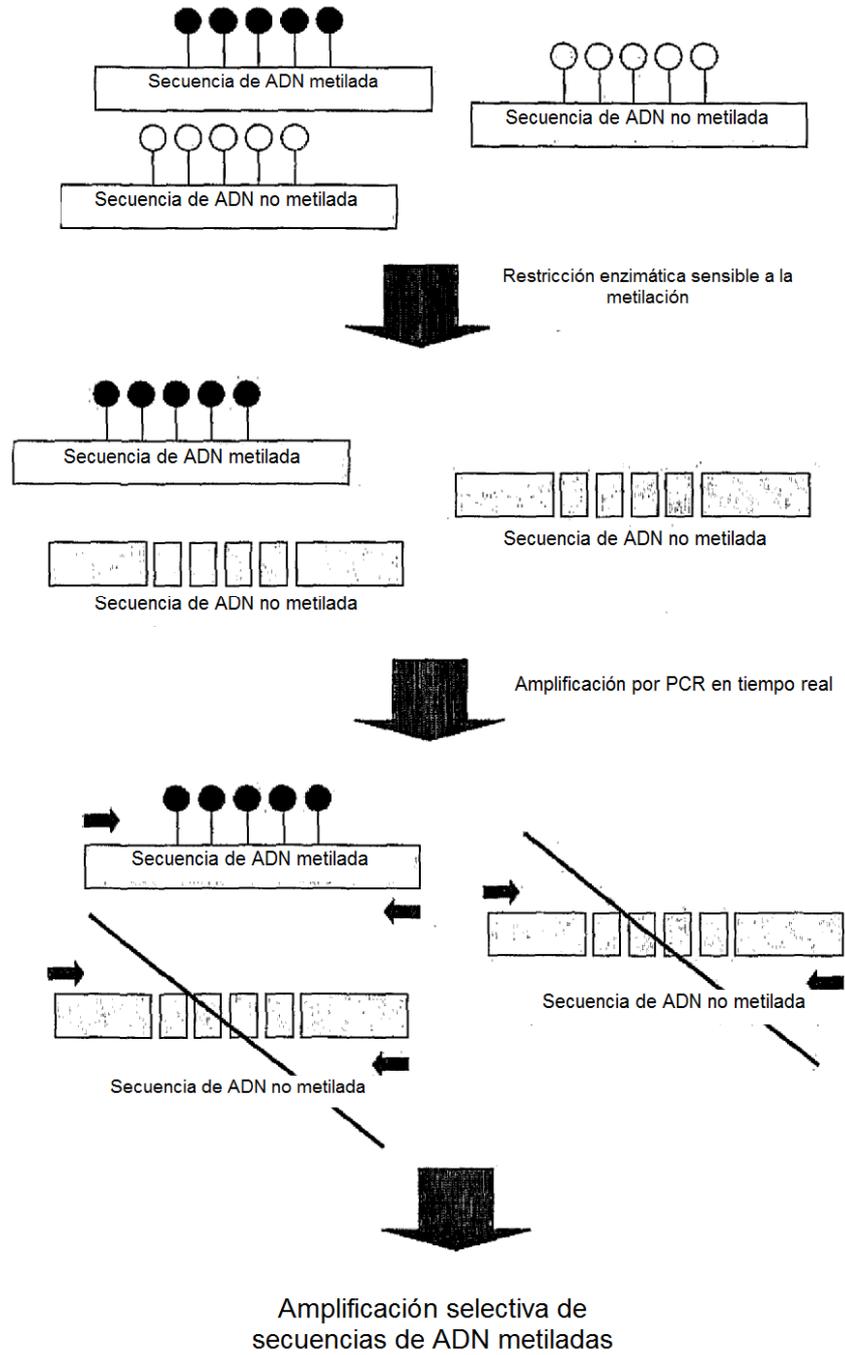
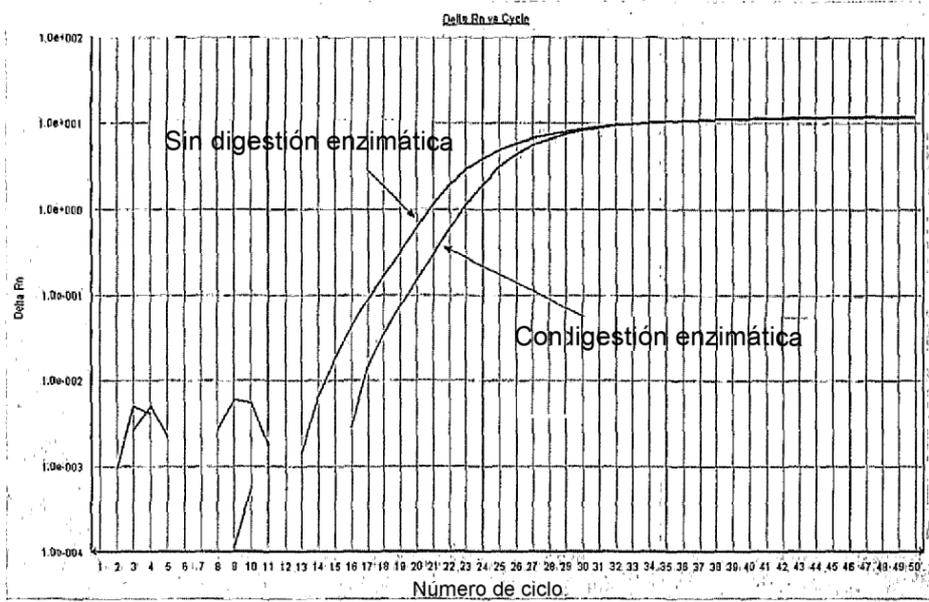


Figura 9a

Placenta *RASSF1A*



Capa leucocitaria materna *RASSF1A*

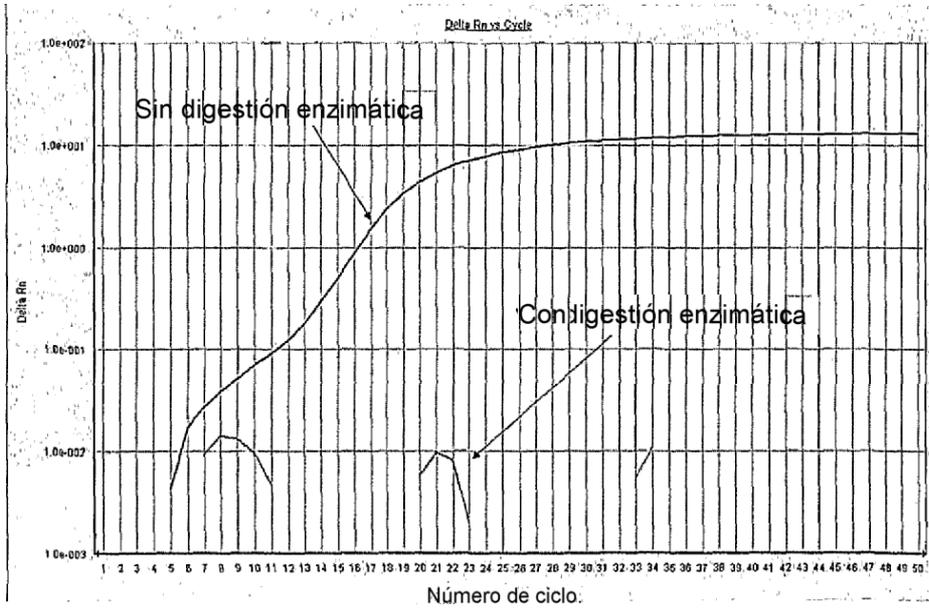
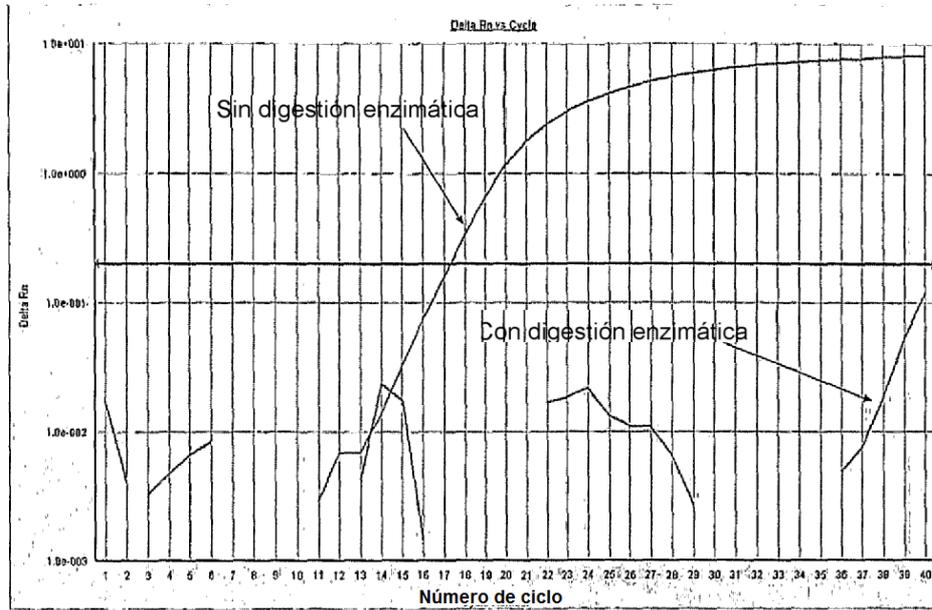


Figura 9b

β -actina de placenta



Capa leucocitaria materna de β -actina

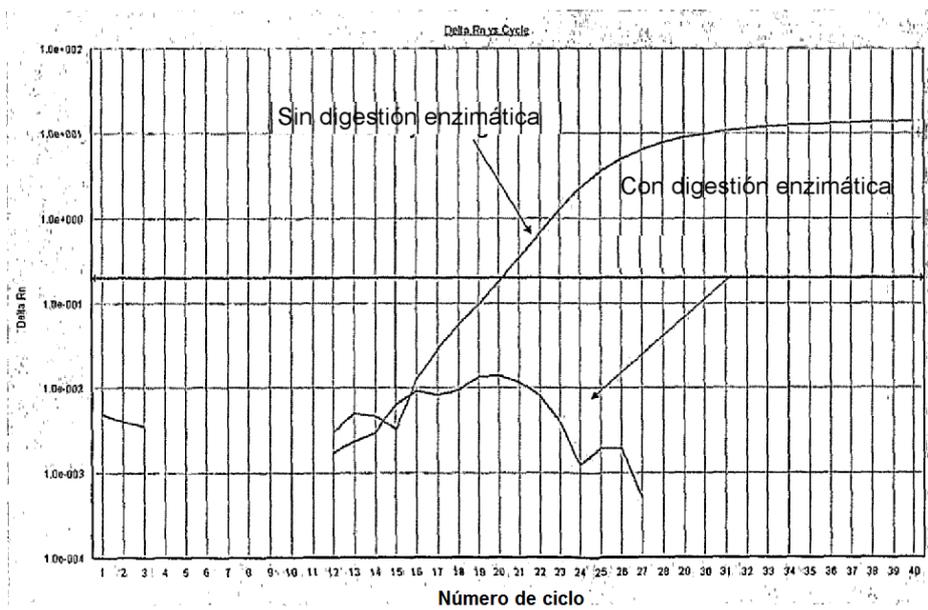


Figura 10a

Digestión completa

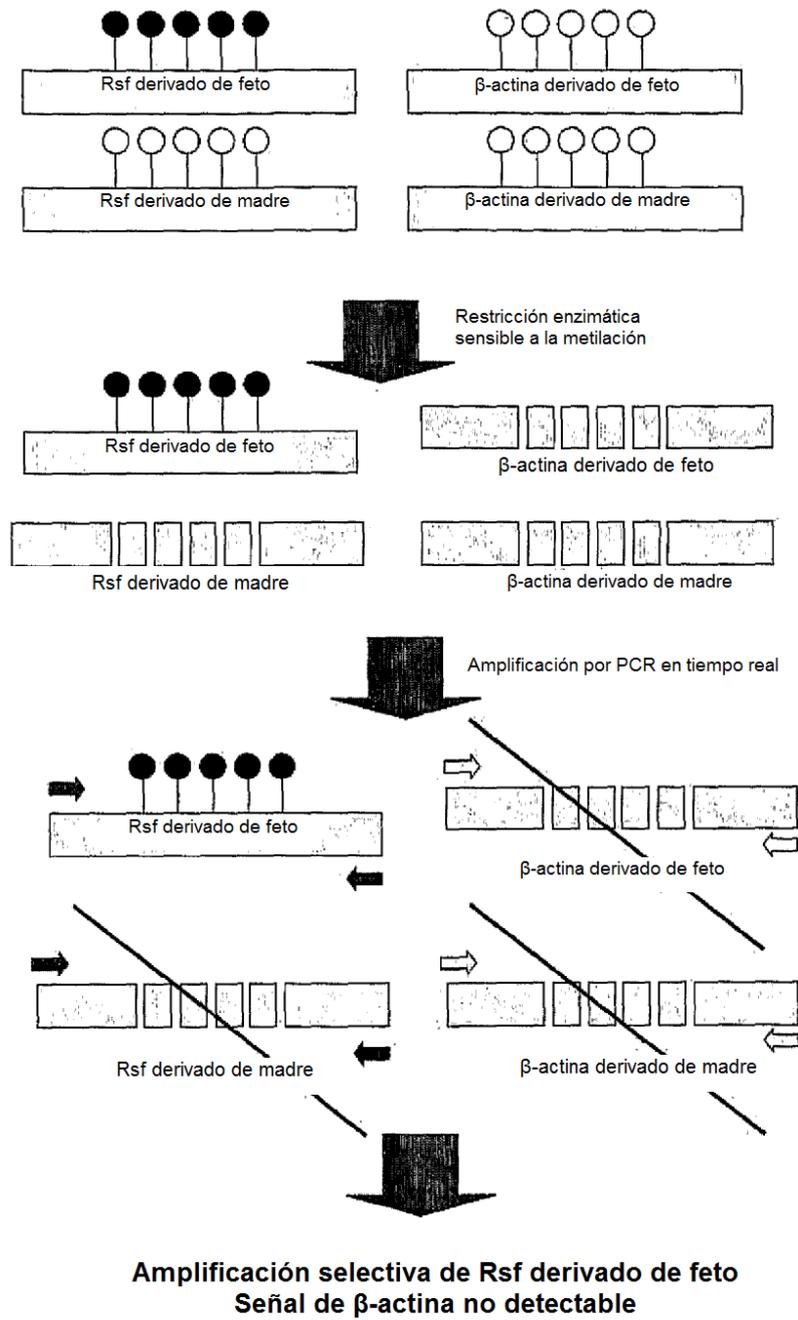


Figura 10b

Digestión incompleta

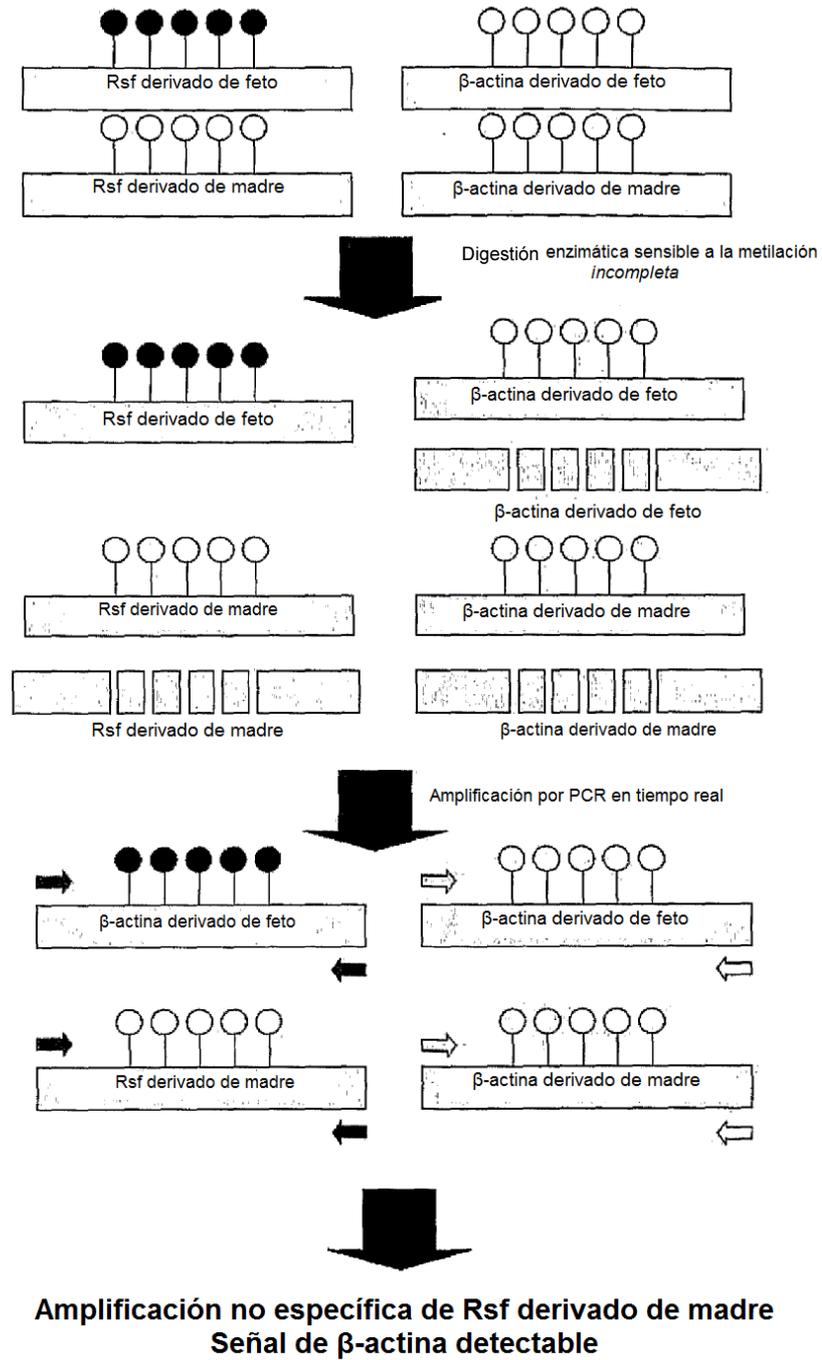
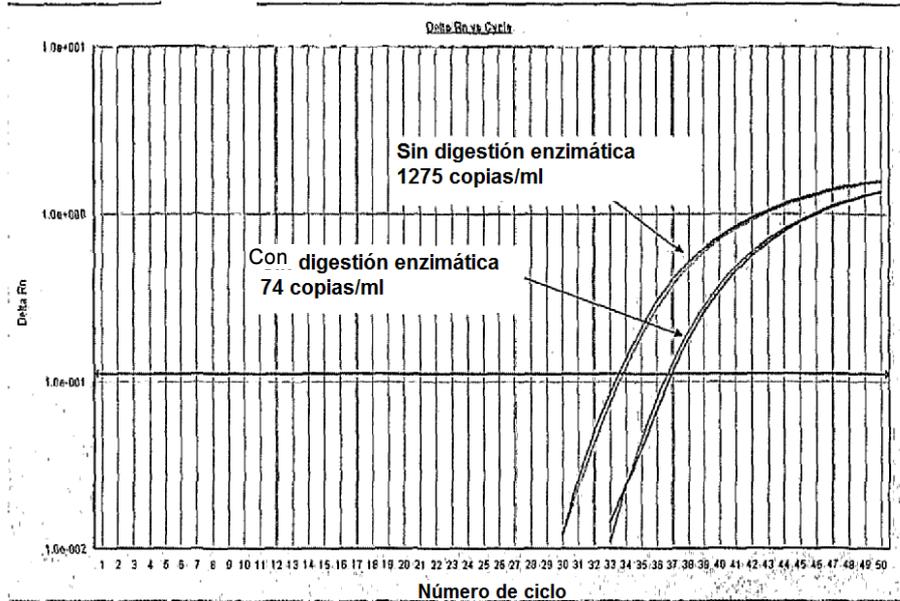


Figura 11a

RASSF1A
Plasma materno 3^{er} trimestre



β -actina
Plasma materno 3^{er} trimestre

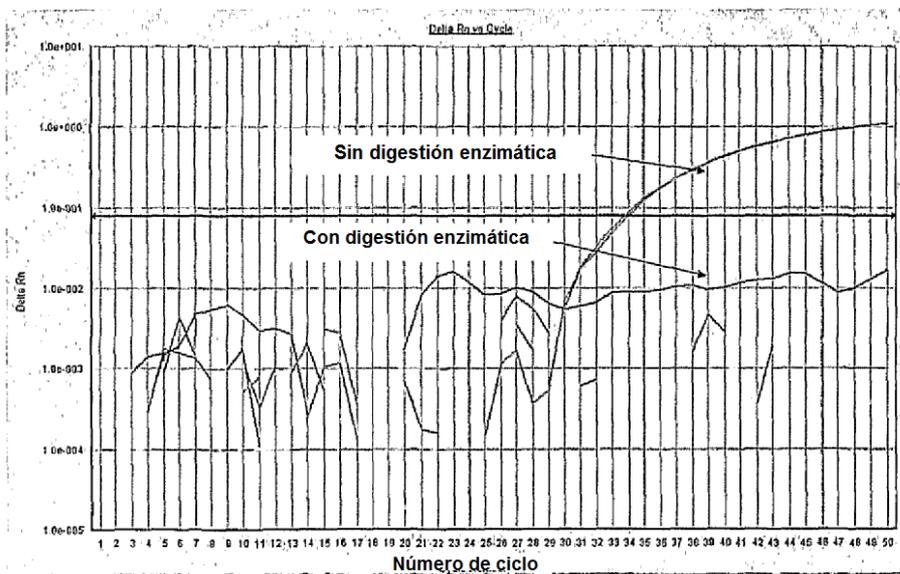
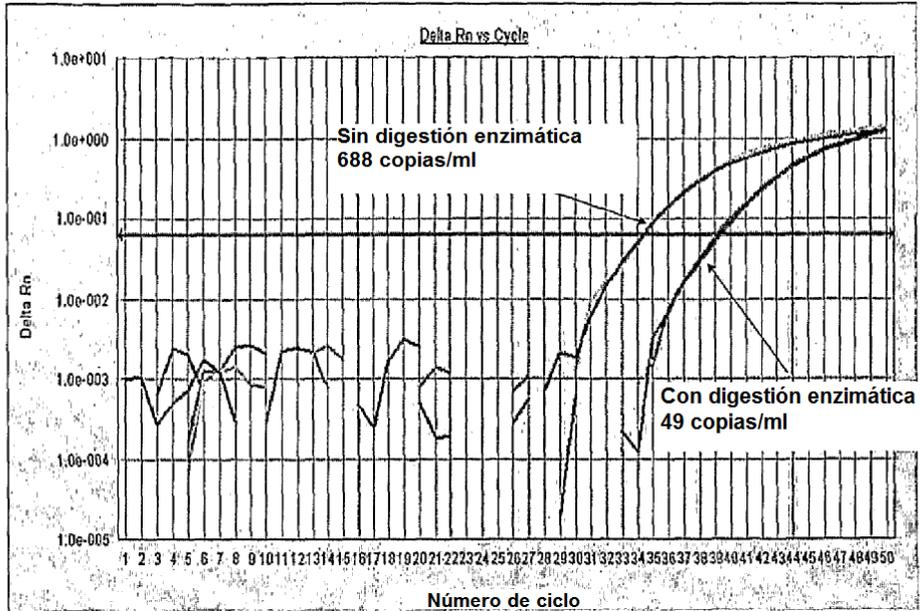


Figura 11b

RASSF1A
Plasma materno 1^{er} trimestre



β-actina
Plasma materno 1^{er} trimestre

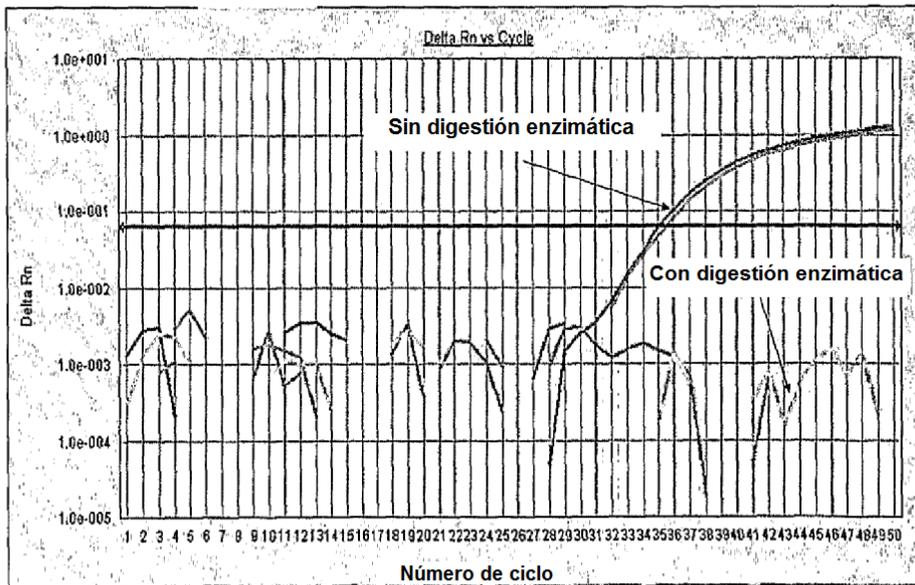
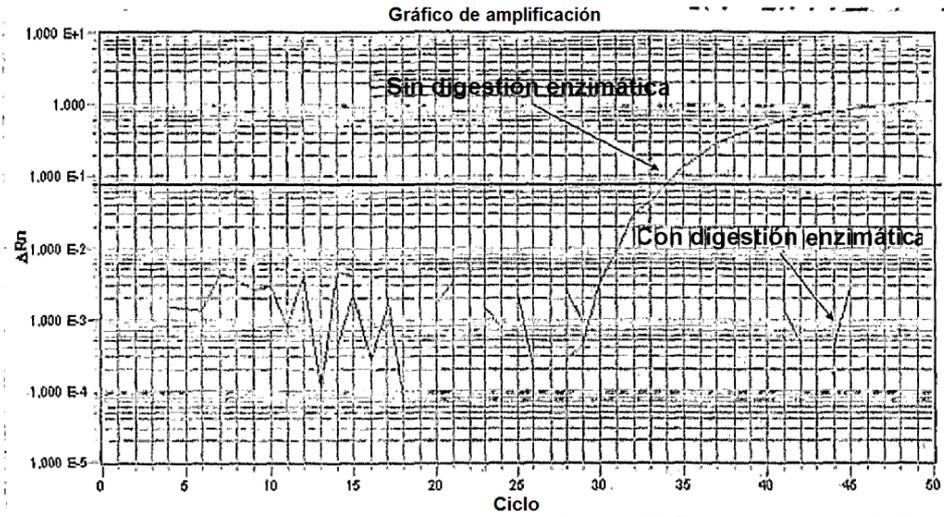


Figura 12

RASSF1A en plasma de no embarazada



B-actina en plasma de no embarazada

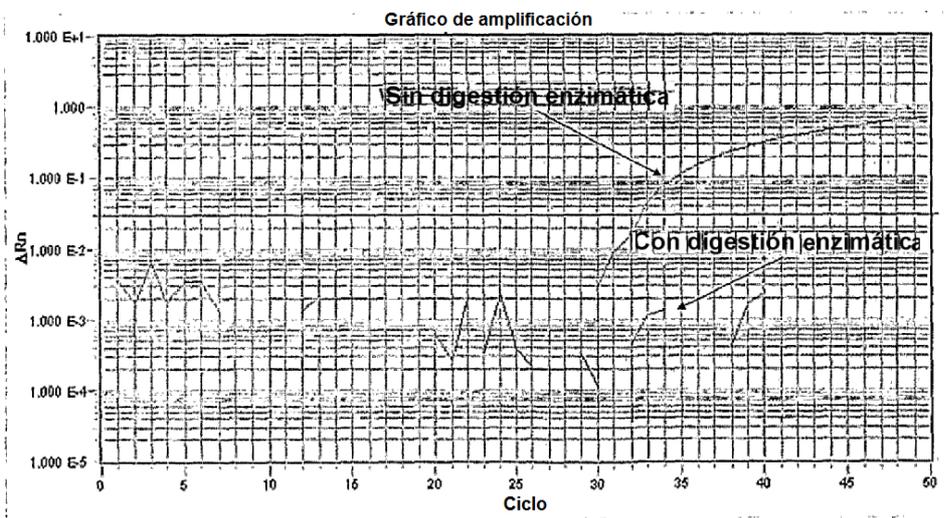


Figura 13

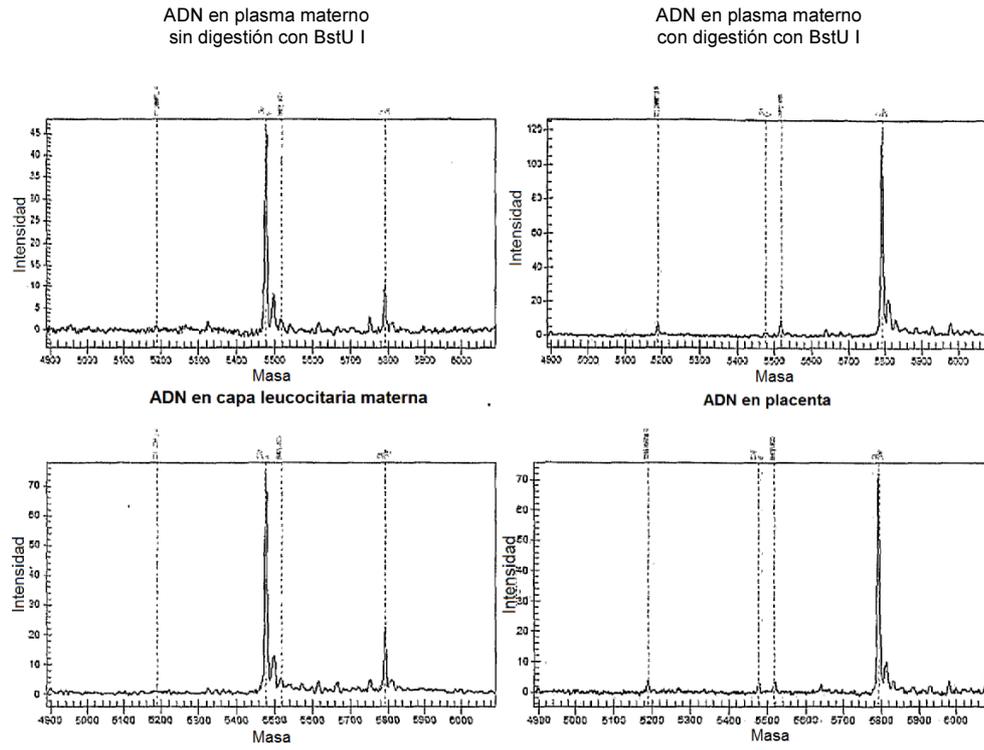


Figura 14

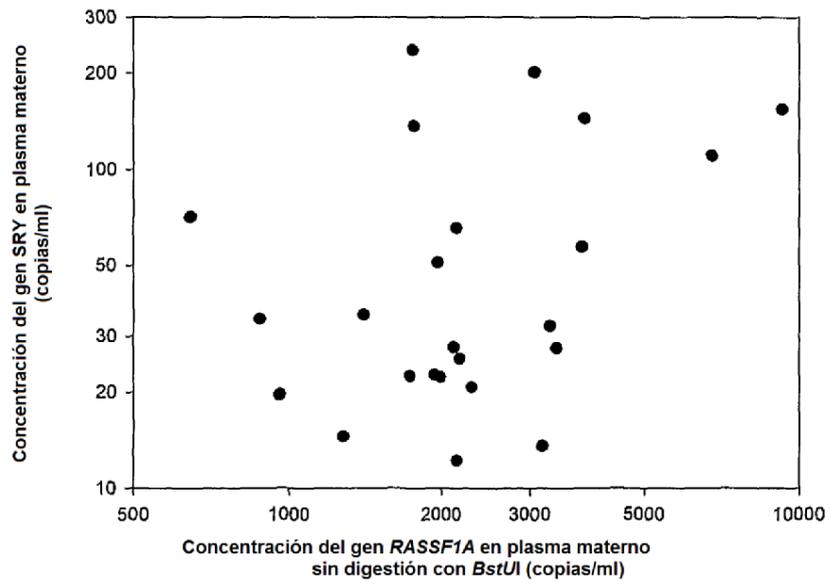
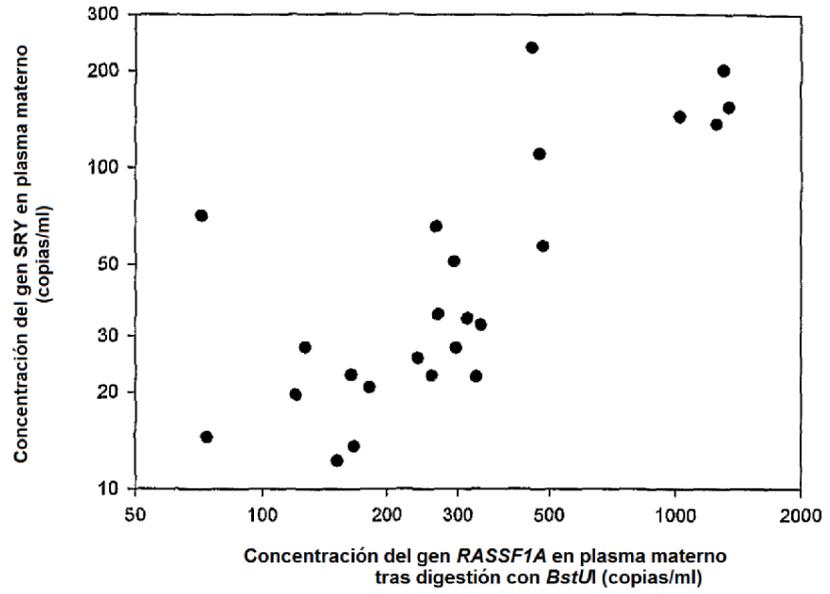


Figura 15

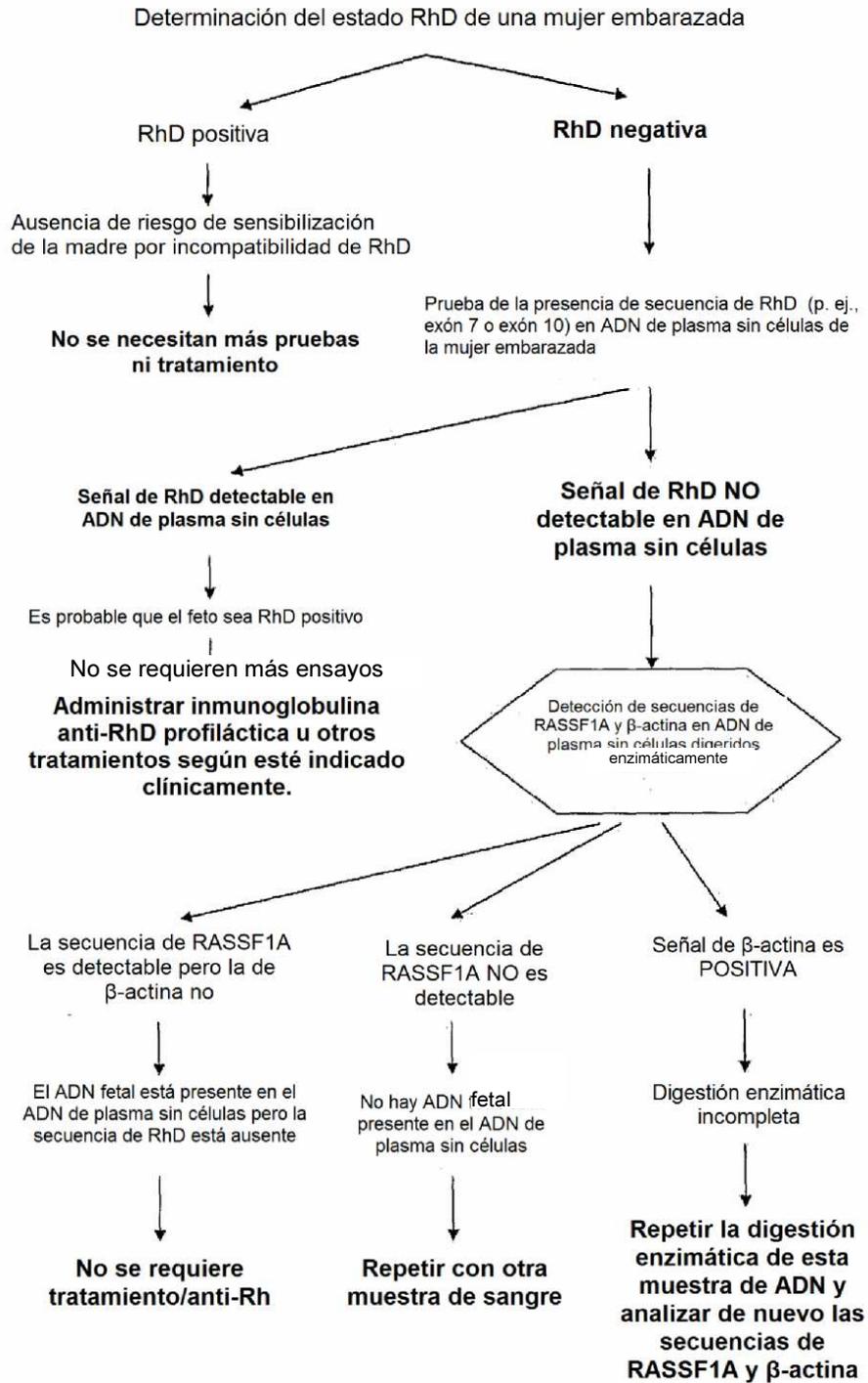


Figura 16

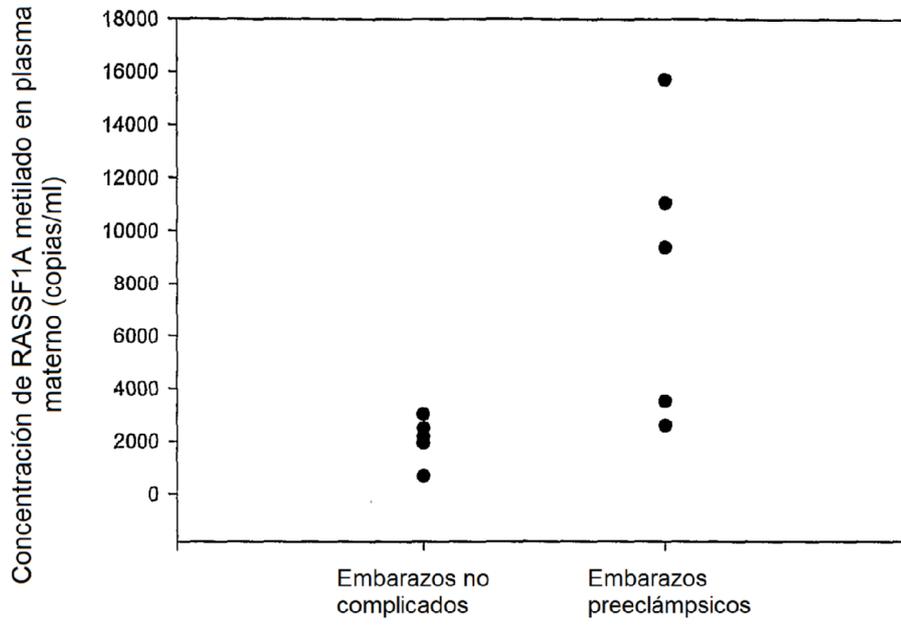


Figura 17

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Longitud del producto (pb)	Cita (si hay)
PCR específica de metilación			
DAB21P-MF	GTAAGGGTGCGGGTTTCGC	230	
DAB21P-MR	GAACCTCACCTCTCATTATCCGCG		

Secuenciación por bisulfito (ser humano)			
HsExón1-F	AAGGGTTTTATTAAGYGTATTAAGAGTT	313	
HsExón1-R	ACCCCRAAAAAAAAACACAAA		

Notas sobre el sufijo oligo, prefijo y sufijo de la secuencia:

- F Cebador directo
- R Cebador inverso

Condiciones de reacción y perfil térmico para la PCR por bisulfito del exón 1 de DAB21P

	<i>Final</i>		
10X Tampón II	1X	95°C	10 min
MgCl ₂	2.0mM	95°C	40s
dNTP	200µM	57°C	40 s x 40 ciclos
Cebador directo	200nM	72°C	40 s
Cebador inverso	200nM	72°C	7 min
AmpliTaQ Gold	1U		
ADN convertido por bisulfito	80ng		
Volumen total de la reacción	25 µl		

Figura 18

