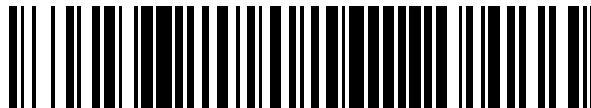


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 147**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2010 E 10000518 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2228453**

54 Título: **Preservación de ácidos nucleicos fetales en plasma materno**

30 Prioridad:

**21.01.2009 US 146065 P**  
**22.07.2009 US 227529 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.06.2017**

73 Titular/es:

**STRECK INC. (100.0%)**  
**7002 SOUTH 109TH STREET**  
**LA VISTA, NE 68128, US**

72 Inventor/es:

**FERNANDO, M. ROHAN y**  
**CHAO-WEI CHEN, KATE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 617 147 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

Preservación de ácidos nucleicos fetales en plasma materno

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud provisional de Estados Unidos Nos de serie 61/146.065, presentada el 21 de enero de 2009 y 61/227.529, presentada el 22 de julio de 2009.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al diagnóstico prenatal de anomalías fetales y, más particularmente, a la preservación de ácidos nucleicos fetales en una muestra de sangre materna.

**Antecedentes de la invención**

10 La demostración de Leon y col. en 1977 de que el ADN libre en el plasma es elevado en los pacientes con cáncer, sentó las bases del interés actual en los ácidos nucleicos libres en el plasma en el diagnóstico de la enfermedad. De manera relativamente reciente, Lo y col. Lancet 350 (1997) 485-487 han identificado la existencia de ácidos nucleicos fetales que circulan libremente en el plasma materno. Desde este trabajo, varios estudios han demostrado que los ácidos nucleicos fetales libres presentes en el plasma materno se pueden utilizar en el diagnóstico prenatal no invasivo.

15 El análisis de los ácidos nucleicos puede servir como un indicador de la vulnerabilidad de los pacientes mediante la identificación de cromosomas y de los genes correspondientes, que representan posibles problemas relacionados con la enfermedad de un paciente o descendencia de un paciente. La investigación ha proporcionado las localizaciones cromosómicas de muchas enfermedades hereditarias y también el genotipo o mutación cromosómica que se corresponde con la enfermedad. A medida que se determinan los marcadores genéticos para estas  
20 enfermedades hereditarias, existe un interés paralelo en identificar a los pacientes que portan estos rasgos genéticos, especialmente cuando tales enfermedades sólo pueden manifestarse en la descendencia de un paciente. Además, las enfermedades hereditarias sólo pueden afectar a un niño si ambos padres llevan un alelo necesario. Las pruebas prenatales se han convertido en una práctica mucho más rutinaria en el interés por identificar a la descendencia que puede verse afectada por una condición hereditaria letal o debilitante. Sin embargo, la dificultad  
25 para obtener el material genético de un feto ha presentado una serie de barreras frente al ensayo de los muchos marcadores genéticos conocidos para la enfermedad hereditaria.

Los procedimientos más exhaustivos y precisos de selección para las anomalías fetales suelen implicar técnicas invasivas tales como la amniocentesis y el muestreo de vellosidades coriónicas. Aunque proporcionan resultados  
30 fiables, a menudo se considera que estos procedimientos conllevan un posible riesgo considerable de complicaciones del embarazo debido a su naturaleza invasiva. En los últimos años, la identificación de ácidos nucleicos fetales en la sangre materna ha llevado a una investigación exhaustiva con un enfoque en el aislamiento de dicho ADN y ARN fetal para ensayar cualquier número de anomalías fetales. Tales ensayos se realizan convenientemente usando solamente una muestra de sangre materna, eliminando así la necesidad de los procedimientos de ensayo invasivos. Desafortunadamente, el aislar los ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos  
35 internos resultó ser un desafío.

Más específicamente, con el fin de obtener resultados coherentes y fiables de los ensayos de ácidos nucleicos fetales dentro de la sangre materna, es importante tanto distinguir los ácidos nucleicos fetales de los ácidos nucleicos maternos como preservar la integridad estructural de los ácidos nucleicos fetales. Tradicionalmente, la primera etapa de aislar el ácido nucleico libre en la sangre es obtener suero o plasma y luego aislar los ácidos nucleicos libres dentro del suero o plasma. Sin embargo, el suero generalmente no es adecuado para el aislamiento de ácidos nucleicos libres, ya que los procesos de coagulación de la sangre liberan ácidos nucleicos celulares que contaminan el ADN libre en plasma (véase la figura 1), así como otras sustancias deletéreas que pueden desestabilizar las células sanguíneas nucleadas. Por lo tanto, los esfuerzos se han dirigido también al plasma como material de partida preferido para el aislamiento de ácidos nucleicos libres. Bajo tal enfoque, se han realizado  
40 esfuerzos de separación de plasma de la sangre para obtener una muestra de plasma sin células. Desafortunadamente, este procedimiento es frecuentemente laborioso y prolongado que requiere realizar múltiples etapas puesto que es importante usar condiciones cuidadosamente controladas para prevenir la rotura de las células durante la centrifugación, lo que contaminaría los ácidos nucleicos libres con ácidos nucleicos celulares liberados durante la rotura. Otra cuestión importante es que el ácido nucleico celular se libera en el plasma debido a la rotura celular durante la incubación *ex vivo*, por lo general en un período de tiempo relativamente corto de un evento de extracción de sangre. Una vez que comienza la lisis de las células maternas, las células maternas lisadas liberan ácidos nucleicos adicionales que se mezclan con los ácidos nucleicos fetales libres y se hace cada vez más difícil recuperar los ácidos nucleicos fetales para ensayos. Además, la cantidad y la capacidad de recuperación del ADN libre disponible disminuirá sustancialmente durante un periodo de tiempo relativamente corto debido a la  
45 degradación (por ejemplo, de la actividad de desoxirribonucleasa (DNasa) o ribonucleasa (RNasa) del ADN libre fetal (lo que reduce el ya limitado suministro de ADN fetal que puede ser recuperado para su análisis). Por ejemplo, después de un período de aproximadamente 36 horas, se espera que una muestra no tratada sea tan suficientemente corrupta que no conduzca a un análisis fiable o concluyente. De este modo, los ácidos nucleicos  
50

libres se aíslan de manera conveniente tan pronto como se separa el plasma, o se puede congelar el plasma a -80 °C hasta que se pueden aislar los ácidos nucleicos. Esto también supone limitaciones prácticas al procedimiento. Por tanto, sería de gran beneficio desarrollar técnicas de muestreo que incrementasen la cantidad de ácidos nucleicos fetales (ADN y/o ARN) recuperables del plasma materno, haciendo más fiable el aislamiento y el ensayo de los ácidos nucleicos fetales y, en consecuencia, mejorando las capacidades de los ácidos nucleicos fetales para el diagnóstico.

Los problemas generalmente asociados con el aislamiento de ácidos nucleicos libres incluyen el tiempo y la naturaleza tediosa de los protocolos de aislamiento tradicionales y el requisito de que las muestras de sangre sean tratadas inmediatamente en un esfuerzo por evitar la lisis de las células maternas. A menudo, las muestras de sangre materna se tratan inmediatamente para eliminar todas las células maternas y el plasma resultante se congela. Sin embargo, este procedimiento es largo y, a menudo, la lisis celular comienza antes de que se eliminen las células. Además, cualquier protocolo para la eliminación de las células maternas, incluyendo la centrifugación de las células maternas de la muestra y la congelación del plasma, puede tener efectos perjudiciales sobre los ácidos nucleicos fetales.

En un esfuerzo por contrarrestar estos problemas y evitar la degradación celular, las muestras de sangre se han sometido a un protocolo que incluye poner en contacto las muestras con formaldehído. El formaldehído se utiliza a menudo para estabilizar las membranas celulares y su uso podría, por lo tanto, reducir la lisis de las células de la madre. También se ha pensado que el formaldehído inhibe la DNasa y la RNasa, aumentando con ello la preservación y la estabilidad de los ácidos nucleicos fetales libres. Los estudios realizados por Dhallan y col. JAMA 291 (2004) 1114-1119 han demostrado una disminución en la lisis celular y un aumento sustancial en la cantidad de ácidos nucleicos fetales libres recuperables. Sin embargo, otros estudios han rebatido estos datos, indicando que el formaldehído no tiene el efecto deseado. Más recientemente, Zhang y col., Clinica Chimica Acta 397 (2008) 60-64, determinaron que el efecto del formaldehído en el porcentaje de ADN fetal en el plasma materno dependía del momento del procedimiento, en el que el formaldehído tiene poco o ningún efecto en muestras procesadas a las 6 horas, pero tiene un efecto de preservación sustancial sobre muestras procesadas a las 36 horas. Más particularmente, se descubrió que las muestras que se pusieron en contacto con formaldehído y se procesaron a las 36 horas tenían lisis celular reducida y una mayor inhibición de la actividad de DNasa plasmática. El uso de formaldehído para tales fines se indica en las Patentes de Estados Unidos Nos. 7.332.277 y 7.442.506.

La posible falta de fiabilidad y las cuestiones de toxicidad que acompañan al procesamiento con formaldehído, determinan que su uso no es conveniente para la preservación de plasma materno. Dadas las inmensas discrepancias con respecto al uso de formaldehído para la preservación de la muestra de ADN fetal, sigue existiendo la necesidad de un protocolo del procedimiento de tratamiento que reduzca consistentemente una o cualquier combinación de lisis celular materna y actividad de DNasa y/o RNasa dentro de muestras de plasma materno. Se desea, además, que dicho protocolo permita un mayor tiempo de almacenamiento de la muestra, de manera que las muestras puedan tomarse de una paciente embarazada y posteriormente se almacenen o se envíen a un lugar remoto para someterlas a ensayo sin temor a una reducción de la integridad de los ácidos nucleicos fetales.

Varios documentos de patente tratan estos procesos para la estabilización, identificación y ensayo de células fetales y/o de ácidos nucleicos localizados en la sangre. Véase, en general, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.447.842; 5.457.024; 5.861.253; 6.258.540; 6.617.170; 6.821.789; 7.332.277 y 7.442.506 y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos. 2007/0111233; 2007/0134658; 2007/0202525; 2008/0020390 y 2008/0108071.

Además, se ha publicado una cantidad sustancial de artículos científicos relacionados con el ADN fetal libre y temas relacionados.

A pesar de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de procedimientos de aislamiento y preservación de ácidos nucleicos fetales que sean más sencillos y menos prolongados. Es deseable, además, que estos procedimientos aumenten la cantidad de ADN y ARN fetal recuperados del plasma materno (por ejemplo, en comparación con procedimientos que no emplean las enseñanzas del presente documento) manteniendo al mismo tiempo la integridad del ADN y del ARN y produciendo resultados de diagnóstico fiables. Los esfuerzos para aumentar la fiabilidad y la coherencia del análisis de ácido nucleico fetal incluyen tratar una muestra de sangre materna de modo que se incremente la cantidad de ADN y/o ARN fetal viable recuperado. La concentración de ADN fetal libre hallado en muestras de plasma materno en el momento de la extracción de sangre varía generalmente de 3,4 % a 6,2 % de la cantidad total de ADN libre que está presente en el plasma, dependiendo del tiempo de gestación.

La presente invención se refiere a la necesidad de un procedimiento eficaz y coherente para preservar y ensayar ácidos nucleicos fetales en el plasma materno. Proporcionando un procedimiento mejorado para la reducción de la lisis de células maternas y la actividad de nucleasa, la presente invención incluye un protocolo que aumenta la cantidad de ácidos nucleicos fetales recuperables, mejorando así la fiabilidad diagnóstica de los ácidos nucleicos fetales. La presente invención ayuda a prevenir la contaminación de ácidos nucleicos libres con ácidos nucleicos celulares que se liberan de células dañadas. La presente invención ayuda además a inhibir la actividad de nucleasa para proteger la integridad del ácido nucleico libre. La estabilización de las células sanguíneas nucleadas dentro de una muestra de sangre hace que ya no sea necesario separar el plasma inmediatamente después de la extracción de sangre. La presente invención puede además permitir que las muestras de sangre se almacenen a temperatura

ambiente durante hasta aproximadamente 14 días sin comprometer la integridad de los ácidos nucleicos libres presentes en el plasma y sin contaminar la muestra con ácidos nucleicos celulares procedentes de células lisadas. La presente invención también puede permitir evitar cualquier congelación del plasma y/o poner en contacto con cualquier formaldehído.

5 Una ventaja de la presente invención es la posibilidad de estabilizar esencialmente de manera simultánea tanto las células sanguíneas nucleadas como los ácidos nucleicos libres. Esto ayuda a prevenir la liberación de ácidos nucleicos genómicos celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos genómicos celulares maternos) en el plasma, y la dilución adicional de los ácidos nucleicos fetales (y biomarcadores asociados) de interés, al mismo tiempo que mantiene la integridad estructural de los ácidos nucleicos fetales. Una posible ventaja adicional de la presente  
10 invención radica en su capacidad para mantener cantidades relativas de ácidos nucleicos fetales. Existe una reposición *in vivo* constante de los ácidos nucleicos fetales para mantener una cantidad coherente de ácidos nucleicos fetales, pero al extraer sangre, las cantidades de ácido nucleico fetal se deteriorarán sin reposición. Las enseñanzas de la presente invención también contemplan la posibilidad de detener la degradación de los ácidos nucleicos fetales después de la extracción de sangre.

### 15 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención contempla un procedimiento exploratorio no invasivo prenatal para la identificación de las características fetales. El procedimiento incluye las etapas de: poner en contacto una muestra de sangre materna extraída, que incluye una pluralidad de células sanguíneas, con un agente protector de ácido nucleico para evitar que las células sanguíneas (i) liberen ácidos nucleicos genómicos a la muestra de sangre y (ii)  
20 experimenten una actividad nucleasa que degrade el ácido nucleico fetal; aislar los ácidos nucleicos fetales de la muestra de sangre materna; y analizar los ácidos nucleicos fetales aislados para identificar una característica fetal, en la que el agente protector incluye glicina e imidazolidinil urea y ácido etilendiaminotetraacético en el que el agente protector contiene menos del 1 % en peso de formaldehído.

Los agentes protectores de ácidos nucleicos incluyen un agente conservante liberador de formaldehído tal como uno seleccionado del grupo que consiste en: diazolidinil urea, imidazolidinil urea, dimetilol-5,5 dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitro-propano-1,3- diol, oxazolidinas, glicinato de hidroximetilo sódico, 5-hidroxi-metoximetil-1-aza-3,7-dioxabicyclo [3.3.0]octano, 5-hidroximetil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octano, 5-hidroxipoli[metileno] metil-1-1 aza-3, 7dioxabicyclo[3.3.0]octano, adamantina cuaternaria y cualquier combinación de los mismos. La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede estar entre aproximadamente 0,1 g/ml y  
30 aproximadamente 3 g/ml. La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede estar entre aproximadamente 0,4 g/ml y aproximadamente 0,8 g/ml. La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede ser una concentración a la que se observa la reticulación de ácidos nucleicos y proteínas, como se indica por electroforesis en gel de agarosa. La cantidad de agente conservante en una muestra tratada puede ser inferior a aproximadamente 20 mg / ml de la muestra de sangre.

La etapa de aislamiento puede incluir aislar el ácido nucleico del plasma materno y aislar el ácido nucleico fetal en ausencia de cualquier célula. Cualquiera o ambas de las etapas de aislamiento o análisis pueden producirse al menos 2 horas, 7 días o incluso 14 días después de que se extraiga la muestra de sangre. Cualquiera o ambas de las etapas de aislamiento o análisis pueden producirse sin y/o antes de cualquier congelación de la muestra de sangre o cualquiera de sus constituyentes (por ejemplo, a una temperatura inferior a aproximadamente -30°C (más preferentemente inferior a aproximadamente -70 °C)).  
40

El ácido nucleico fetal puede ser ADN, ARN o ambos. La etapa de análisis, la etapa de aislamiento o ambas pueden incluir una etapa de poner en contacto el ácido nucleico fetal con una enzima, un amplificador o ambos. La etapa de contacto puede tener lugar en un tubo de recogida de sangre en el que se extrae la muestra de sangre (por ejemplo, mientras la muestra de sangre entra en un tubo de recogida de sangre). La etapa de puesta en contacto puede tener  
45 lugar a medida que se extrae la muestra de sangre. La etapa de puesta en contacto puede ser suficiente para que después de un período de al menos 7 días (o incluso 14 días) desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la cantidad de ácido nucleico fetal sea al menos aproximadamente 90% de la cantidad de ácido nucleico fetal en el momento en que se extrae la muestra de sangre. La etapa de puesta en contacto puede ser suficiente para que después de un período de al menos 7 días a partir del momento en que se extrae la muestra de sangre, la cantidad de ácido nucleico fetal presente en la muestra sea aproximadamente el 100% de la cantidad de ácido nucleico fetal presente en la muestra en el momento en que se extrae la muestra de sangre. La etapa de puesta  
50 contacto puede ser suficiente para que después de un período de al menos aproximadamente 14 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la concentración de ácido nucleico fetal con relación al ácido nucleico total en la muestra de sangre que está presente es al menos aproximadamente 10 hasta al menos aproximadamente 50 veces la cantidad de ácido nucleico fetal que estaría presente en ausencia de la etapa de  
55 puesta en contacto.

El agente protector puede incluir un inhibidor de la nucleasa seleccionado del grupo que consiste en: pirocarbonato de dietilo, etanol, ácido aurintricarboxílico (ATA), formamida, complejos de vanadil ribonucleósido, maquileno, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), proteinasa K, heparina, hidroxilamina-oxígeno-ion cúprico, bentonita, sulfato de amonio, ditiotreitil (DTT), betamercaptoetanol, cisteína, ditiotreitil, clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfeno, un  
60

cación divalente tal como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y cualquier combinación de los mismos. El agente protector puede incluir un anticoagulante seleccionado del grupo que consiste en heparina, ácido etilendiaminotetraacético, citrato, oxalato y cualquier combinación de los mismos. El agente protector puede incluir un agente conservante y un anticoagulante. El agente de protección puede incluir imidazolidinil urea y ácido etilendiaminotetraacético.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN celular presentes como resultado de la fuga de células dentro de dos muestras de sangre almacenadas a temperatura ambiente a lo largo del tiempo; Se observa una gráfica de datos de "ADN BCT" que se extiende sustancialmente a lo largo del eje x en un valor de cero (0) del eje y (0 ADN).

La Figura 2 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN cromosómico Y presentes como resultado de la fuga de células blancas masculinas dentro de dos muestras de sangre hembra a lo largo del tiempo; Nuevamente se ve un gráfico de "ADN BCT sin células" que se extiende sustancialmente enteramente a lo largo del eje x con un valor del eje y de cero (0) ADN.

La Figura 3 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN libre presente en las muestras de sangre durante el tiempo adicional usando ADN lambda como marcador.

La Figura 4 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN fetal libre presente dentro de dos muestras de sangre a lo largo del tiempo usando como marcador la región promotora de RASSF1A.

La Figura 5 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN de plasma a lo largo del tiempo en una muestra de sangre extraída en tubos convencionales con  $K_3EDTA$ . En cada diagrama de caja y bigotes, la cantidad total de ADN libre en plasma se representa como equivalentes de genoma por mililitro de plasma (GE/ml). La línea dentro de la caja indica el valor de la mediana. Los límites de la caja representan los percentiles 75 y 25. Las barras de error superior e inferior indican los percentiles 10 y 90, respectivamente. Los puntos superior e inferior indican los valores máximo y mínimo. El eje y está en una escala logarítmica.

La Figura 6 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN de plasma a lo largo del tiempo en una muestra de sangre extraída en un dispositivo de las presentes enseñanzas. En cada diagrama de caja y bigotes, la cantidad total de ADN libre en plasma se representa como equivalentes de genoma por mililitro de plasma (GE/ml). La línea dentro de la caja indica el valor de la mediana.

Los límites de la caja representan los percentiles 75 y 25. Las barras de error superior e inferior indican los percentiles 10 y 90, respectivamente. Los puntos superior e inferior indican los valores máximo y mínimo. El eje y está en una escala logarítmica.

La Figura 7 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN libre fetal a lo largo del tiempo en una muestra de sangre extraída en tubos convencionales con  $K_3EDTA$ . En cada diagrama de caja y bigotes, el porcentaje de ADN libre en plasma se representa como equivalentes de genoma por mililitro de plasma (GE/ml). La línea dentro de la caja indica el valor de la mediana. Los límites de la caja representan los percentiles 75 y 25. Las barras de error arriba y abajo indican los percentiles 10 y 90, respectivamente. Los puntos superior e inferior indican los valores máximo y mínimo. El eje y está en una escala logarítmica. Con el tiempo, se observó una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de ADN libre fetal sólo en los tubos con  $K_3EDTA$  (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  por la prueba t de Student pareada).

La Figura 8 es una representación gráfica ilustrativa que muestra las cantidades relativas de ADN libre fetal a lo largo del tiempo en una muestra de sangre extraída en un dispositivo de las presentes enseñanzas. En cada diagrama de caja y bigotes, el porcentaje de ADN libre en plasma se representa como equivalentes de genoma por mililitro de plasma (GE/ml). La línea dentro de la caja indica el valor de la mediana. Los límites de la caja representan los percentiles 75 y 25. Las barras de error superior e inferior indican los percentiles 10 y 90, respectivamente. Los puntos superior e inferior indican los valores máximo y mínimo. El eje y está en una escala logarítmica. Con el tiempo, se observa una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de ADN libre fetal sólo en los tubos con  $K_3EDTA$  (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  por la prueba t de Student pareada).

La Figura 9 es una representación gráfica ilustrativa que muestra la amplificación del ADN libre fetal del plasma materno mediante amplificación del genoma completo (WGA, por sus siglas en inglés *Whole Genome Amplification*). Una alícuota (sin amplificación) se utiliza directamente para cuantificar (por PCR en tiempo real) la secuencia SRY del cromosoma Y del plasma materno (un indicador de ADN fetal en el plasma materno). La otra alícuota (con amplificación) se somete a WGA y luego se realiza la cuantificación de la secuencia de SRY por PCR en tiempo real. El enriquecimiento en ADN fetal libre en plasma materno por ochenta veces se observa con WGA. Se utiliza una construcción de ADN plasmídico que contiene una sola copia de la secuencia SRY del cromosoma Y para trazar la curva patrón para la cuantificación.

### **Descripción detallada**

En general, la invención contempla un procedimiento de detección prenatal que incluye el aislamiento y la preservación de ácidos nucleicos fetales situados dentro de la sangre materna. Una única etapa de conservación actúa para aumentar la cantidad de ácidos nucleicos fetales recuperables, mejorando así las capacidades de diagnóstico del ADN y del ARN fetal.

Más particularmente, la presente divulgación proporciona un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos fetales incluyendo una etapa de conservación que incluye el contacto de una muestra de sangre materna con un agente protector. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN o cualquier combinación de los mismos. El ácido nucleico fetal puede ser ADN o ARN libre. Las muestras a partir de las cuales se pueden aislar los ácidos nucleicos incluyen cualquier muestra de sangre materna. Los ácidos nucleicos fetales pueden localizarse en el plasma materno. El procedimiento revelado en el presente documento permite el aislamiento y la preservación eficaces de los ácidos nucleicos fetales evitando al mismo tiempo la confusión con los ácidos nucleicos maternos que entran en una muestra de sangre debido a la lisis celular materna después de la extracción de sangre.

El procedimiento para mejorar el aislamiento de ácido nucleico fetal a partir de una muestra de sangre materna comienza poniendo en contacto una muestra de sangre con un agente protector que contiene un principio activo para mantener la integridad de los componentes dentro de la muestra. Los ingredientes que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, diazolidinil urea, imidazolidinil urea, dimetilol - 5,5 dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, oxazolidinas, hidroximetil glicinato de sodio, 5-hidroximetoximetil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroxipolil[metilenooxi]metil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, adamantina cuaternaria, ácido 2-aminoacético o cualquier combinación de los mismos. Los componentes preferidos se seleccionan del grupo que consiste en diazolidinil urea (DU), imidazolidinil urea (IDU) y cualquier combinación de los mismos.

El agente protector puede consistir esencialmente en el principio activo. Puede ser al menos aproximadamente 10 %, 50 %, o incluso 80 % en volumen del agente protector. Por ejemplo, la cantidad de principio activo dentro del agente protector utilizado puede ser generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 gramos por litro. La cantidad de principio activo dentro del agente protector puede ser de al menos aproximadamente 25 gramos por litro o incluso 50 gramos por litro. La cantidad de principio activo dentro del agente protector puede ser menor de aproximadamente 1500 gramos por litro o incluso 1200 gramos por litro. Por ejemplo, el agente protector puede comprender de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,4 gramos de un agente de conservación del liberador de formaldehído (por ejemplo, IDU) por 0,2 ml del agente protector total.

Tal como se utiliza a lo largo de las presentes enseñanzas, la composición de agente protector preferentemente es sustancialmente no tóxica. Por ejemplo, los procedimientos en el presente documento (y las composiciones utilizadas en el presente documento) pueden estar libres de adición y/o manipulación separada de cualquier concentración significativa (por ejemplo, menos de aproximadamente el 1 % en peso, más preferentemente menos de aproximadamente 2000 partes por millón, más preferentemente menos de aproximadamente 1000 partes por millón, y aún más preferentemente menos de aproximadamente 500 partes por millón) de formaldehído y/o paraformaldehído antes de cualquier contacto con una muestra de producto sanguíneo.

El agente protector puede incluir un inhibidor de nucleasa en una cantidad adecuada para evitar que la actividad de DNasa y RNasa disminuya adicionalmente (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 % en peso y más preferentemente al menos aproximadamente 50 % en peso) la calidad y la cantidad de ácidos nucleicos fetales recuperables de la muestra de sangre en comparación con una muestra que no incluye un inhibidor de nucleasa. Los inhibidores de la nucleasa que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, pirocarbonato de dietilo, etanol, ácido aurintricarboxílico (ATA), formamida, complejos de vanadil ribonucleósido, maquileno, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), proteinasa K, heparina, hidroxilamina-oxígeno-ion cúprico, bentonita, sulfato de amonio, ditiotreitil (DTT), betamercaptoetanol, cisteína, ditioeritritol, clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfeno, un catión divalente tal como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , y cualquier combinación de los mismos. Además, el agente protector puede estar sustancialmente libre de sales de guanidinio, dodecilsulfato sódico (SDS), o cualquier combinación de los mismos.

La puesta en contacto inicial de la muestra de sangre puede ser durante un tiempo suficiente como para inhibir la lisis de células maternas, la actividad de nucleasa, o cualquier combinación de las mismas. La puesta en contacto puede producirse durante al menos unos 10 segundos, más preferentemente al menos aproximadamente 1 minuto, aún más preferentemente al menos unos 2 minutos. El contacto puede ocurrir durante períodos de tiempo más largos. Por ejemplo, el contacto puede comenzar sustancialmente de manera contemporánea desde el momento de la extracción de sangre (por ejemplo, en menos de aproximadamente 10 minutos del drenaje de sangre) y puede durar hasta que se aislen, se seleccionen y/o se ensayen los ácidos nucleicos. La etapa de puesta en contacto también se puede emplear para proporcionar una muestra con una vida útil más larga. Por lo tanto, es posible que transcurra un lapso de tiempo de al menos aproximadamente 2 horas, más preferentemente al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 7 días o incluso al menos aproximadamente 14 días puede transcurrir entre el momento de extracción de sangre (que puede ser sustancialmente contemporáneo con la etapa de puesta en contacto), y el tiempo de cualquier ensayo o selección de la muestra, y/o aislamiento de los ácidos nucleicos.

El agente protector puede comprender un agente activo en solución. Los disolventes adecuados incluyen agua, solución salina, dimetilsulfóxido, alcohol y mezclas de los mismos. El agente protector puede comprender diazolidinil urea (DU) y / o imidazolidinil urea (IDU) en una solución salina tamponada. El agente protector puede comprender además EDTA y ácido 2-aminoacético. Alternativamente, el agente protector puede contener solamente un fijador (por ejemplo, un principio activo) y puede carecer de cualquier aditivo adicional.

La cantidad de cualquier principio activo dentro del agente protector puede ser generalmente de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 % en peso. El principio activo o fijador puede comprender aproximadamente del 70 % a aproximadamente el 90 % en peso del agente protector. El agente protector puede contener además un anticoagulante tal como aproximadamente del 5 % a aproximadamente el 20 % en peso de EDTA. El agente protector puede contener aproximadamente el 10 % en peso de EDTA. El agente protector puede incluir de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 40 % en peso de inhibidor de nucleasa.

La cantidad de principio activo o fijador (por ejemplo, el liberador de formaldehído) con respecto a la cantidad de EDTA puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 partes (más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 partes) en peso de fijador a aproximadamente 1 parte en peso de EDTA. La cantidad de agente protector dentro de un tubo antes de la extracción de sangre puede ser de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,0 ml y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 ml.

La combinación de un principio activo o fijador (por ejemplo, el liberador de formaldehído) y un anticoagulante dentro del agente protector da como resultado una capacidad mejorada para mantener la cantidad y la calidad del ADN fetal dentro de una muestra de sangre materna. Estos resultados se creen inesperados y superiores a los resultados obtenidos por el uso de sólo el fijador o sólo el anticoagulante. Por lo tanto, se cree que puede producirse un efecto sinérgico cuando se combinan tanto un fijador como un anticoagulante. Las composiciones descritas en el presente documento contemplan específicamente la posibilidad de incluir la combinación de un liberador de formaldehído y un anticoagulante.

El agente protector puede estar situado dentro de un dispositivo especializado, en el que el agente protector ya está presente en el dispositivo antes de la adición de la muestra de sangre, tal como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0137417. El dispositivo puede ser un recipiente de recogida al vacío, normalmente un tubo. El tubo puede estar hecho de un material transparente que también resista la adherencia de las células dentro de una muestra dada. La pared interior del tubo puede revestirse o tratarse de otra manera para modificar sus características superficiales, de modo que se vuelva más hidrófoba y/o más hidrófila, sobre toda o una parte de su superficie. El tubo puede tener una pared interior pulverizada por llama, sometida a descarga corona, tratada con plasma, revestida o tratada de otra manera. El tubo puede tratarse poniendo en contacto una pared interior con una sustancia, de forma que los ácidos nucleicos de interés resistan la adhesión a las paredes del tubo. La superficie del tubo puede modificarse para proporcionar una funcionalidad dual que proporcione simultáneamente un equilibrio apropiado de hidrofilia e hidrofobicidad deseadas, para permitir la recogida de sangre, dispersión del agente protector descrito en el presente documento, resistiendo al mismo tiempo la adhesión de ácidos nucleicos a la pared interna del tubo de recogida de sangre.

Es posible que cualquier recubrimiento pueda ser un revestimiento polimérico funcionalizado que incluya un primer polímero y una o más segundas funcionalidades monoméricas y/o poliméricas que sean diferentes (por ejemplo, químicamente diferentes) del primer polímero. El recubrimiento puede incluir uno o más copolímeros (por ejemplo, copolímero de bloques, copolímero de injerto, o de otro modo). Por ejemplo, puede incluir un copolímero que incluye una primera porción polimérica hidrófoba, y una segunda porción polimérica hidrófila. El recubrimiento puede ser un recubrimiento a base de agua. El recubrimiento puede incluir opcionalmente un promotor de adhesión. El recubrimiento puede aplicarse de cualquier manera adecuada, puede ser pulverizado, sumergido, limpiado con cepillo, o aplicado de otra manera sobre todo o parte del interior del tubo de recogida de sangre. El recubrimiento también se puede aplicar en presencia de calor. Preferentemente, cualquier recubrimiento aplicado a la pared interior de un tubo de recogida de sangre formará una unión suficientemente tenaz con el vidrio (por ejemplo, el vidrio de borosilicato) u otro material (por ejemplo, material polimérico) del tubo, de modo que no se erosione o se retire de otra manera desde la pared interior. Ejemplos de revestimientos poliméricos adecuados pueden incluir polímeros que contienen silicio (por ejemplo, silanos, siloxanos, o de otro modo); poliolefinas tales como polietileno o polipropileno; tereftalato de polietileno; polímeros fluorados (por ejemplo, politetrafluoroetileno); cloruro de polivinilo, poliestireno o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de enseñanzas que pueden emplearse para recubrir el interior de un tubo de recogida de sangre se pueden encontrar en las Patentes de Estados Unidos N° 6.551.267; 6.077.235; 5.257.633 y 5.213.765.

El tubo, tal como se ha descrito anteriormente, puede incluir preferentemente un agente anticoagulante y un principio activo tal como un agente fijador que incluye, pero no se limita a los principios activos descritos en el presente documento. El tubo también puede incluir además un inhibidor de nucleasa. Preferentemente, los compuestos incluidos en el tubo están en una cantidad suficiente como para preservar la morfología celular materna y prevenir la degradación celular, mientras que también previenen la actividad DNasa y RNasa perjudicial de los ácidos nucleicos libres fetales. Sin embargo, la cantidad de agente protector también puede ser suficientemente pequeña como para que se evite sustancialmente cualquier dilución consecuente de la muestra, y los ácidos nucleicos libres en la muestra no se diluyan materialmente. Una muestra de sangre puede fijarse simultáneamente a medida que se introduce en el tubo especializado. El tubo también se puede recubrir, sobre una pared exterior, con un recubrimiento protector (por ejemplo, una barrera de contención que ayude a controlar la fragmentación del fragmento de vidrio) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.419.832.

Adicionalmente, el agente protector puede estar en un estado sólido altamente viscoso o sustancial, de tal manera que (por ejemplo) puede utilizarse eficazmente como un revestimiento en estado sólido sustancial. Pueden

5 encontrarse ejemplos de tales conservantes en estado sólido sustancial en la Solicitud de patente de Estados Unidos del propio solicitante en trámite junto con la presente con N.º de serie 12/646.204, presentada el 23 de diciembre de 2009. Se pueden realizar técnicas de eliminación de líquidos sobre el agente protector para obtener un agente protector sustancialmente sólido. Las condiciones de eliminación del líquido pueden ser tales que resulten en la eliminación de al menos aproximadamente el 50 % en peso, al menos aproximadamente el 75 % en peso, o al menos aproximadamente el 85 % en peso de la cantidad original del agente protector líquido dispensado. Las condiciones de eliminación del líquido pueden ser tales que resulten en la eliminación de suficiente líquido, de manera que la composición resultante esté en forma de una película, gel u otra capa sustancialmente sólida o altamente viscosa. Por ejemplo, puede dar como resultado un revestimiento sustancialmente inmóvil (preferentemente un revestimiento que puede redisolverse o dispersarse de otro modo, en contacto con una muestra de producto de sangre). Es posible que la liofilización, u otras técnicas, se puedan emplear para realizar una forma sustancialmente sólida del agente protector (por ejemplo, en forma de uno o más gránulos). De este modo, las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser tales que resulten en un material que al entrar en contacto con la muestra considerada (por ejemplo, una muestra de sangre materna), el agente protector se dispersará en la muestra y conservará sustancialmente componentes en la muestra (por ejemplo, ácidos nucleicos). Las condiciones de eliminación del líquido pueden ser tales que resulten en una composición restante que carezca sustancialmente de cristalinidad; que tenga una viscosidad que sea lo suficientemente alta como para que la composición restante sea sustancialmente inmóvil a temperatura ambiente (por ejemplo, no muestre ningún flujo visiblemente detectable (como se ve a simple vista) cuando se mantiene en un dispositivo de almacenamiento a temperatura ambiente en una pendiente de mínimo 45 ° durante al menos una hora); o ambos. También puede emplearse un colorante.

10 Como se indica en el presente documento, el contacto con una muestra de sangre o plasma materno con el agente protector, permite almacenar la muestra durante un período de tiempo antes de aislar y ensayar los ácidos nucleicos fetales. Más preferentemente, se puede extraer una muestra de sangre o plasma materna en un lugar (por ejemplo, un centro de salud), ponerse en contacto con el agente protector y posteriormente transportarla a un lugar remoto diferente (por ejemplo, un laboratorio, como uno que esté por separado Alojados a una distancia de al menos 1 km, 2 km, 3 km o más lejos del sitio de extracción) para el procedimiento de aislamiento y ensayo de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos fetales se pueden aislar de la muestra de sangre o plasma materna y se ensayan para detectar diversas características fetales (incluyendo pero no limitándose a anomalías cromosómicas) en la localización remota y la información diagnóstica resultante puede ser reportada al sitio del drenaje original de sangre. El procedimiento de aislamiento de ácido nucleico fetal puede realizarse en una localización remota y la información resultante puede analizarse para identificar características fetales incluyendo anomalías cromosómicas en una tercera localización. Además, los resultados del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico fetal pueden ser enviados de vuelta al sitio del drenaje inicial de sangre y analizados allí. La información de diagnóstico resultante puede entonces enviarse a una tercera ubicación o volver a la ubicación remota o al sitio del drenaje inicial de sangre.

15 En cualquier momento después del contacto inicial de la muestra de sangre materna o plasma con el agente protector, la muestra puede tratarse para aislar los ácidos nucleicos fetales libres localizados en la sangre materna. Los ácidos nucleicos se pueden aislar usando cualquier procedimiento de aislamiento incluyendo los procedimientos desvelados en la solicitud del propio solicitante con N.º de serie 12/211.990.

20 Preferentemente, las células sanguíneas maternas permanecerán generalmente intactas, de modo que los ácidos nucleicos maternos procedentes de células sanguíneas rotas no se liberen en la muestra, dificultando el aislamiento de los ácidos nucleicos fetales. El fijador actúa para prevenir la lisis celular, de modo que las células maternas permanecen intactas y sustancialmente todos los ácidos nucleicos maternos permanecen intracelulares para evitar la contaminación no deseada de los ácidos nucleicos fetales libres.

25 Después de haber aislado los ácidos nucleicos fetales, se pueden ensayar para identificar diversas características fetales que incluyen, pero no se limitan a, sexo del feto, preeclampsia en la madre, factor Rh del feto y presencia de cualquier anomalía cromosómica, incluyendo pero sin limitarse a, inversiones cromosómicas, translocaciones, aneuploidías, otras mutaciones, o cualquier combinación de las mismas. Por lo tanto, los procedimientos en el presente documento contemplan una etapa de ensayo de ácidos nucleicos. El ensayo de los ácidos nucleicos fetales se puede realizar usando cualquier procedimiento de ensayo de ácido nucleico incluyendo, pero sin limitarse a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR), electroforesis en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas, detección por fluorescencia, espectrometría ultravioleta, hibridación de ADN, reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo, ensamblaje cíclico de polimerasa (PCA), reacción en cadena de la polimerasa asimétrica, PCR específica de intersecuencia (ISSR), reacción en cadena de la polimerasa inversa, reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligación, reacción en cadena de la polimerasa específica por metilación (MSP), reacción en cadena de la polimerasa múltiple, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida, o cualquier combinación de las mismas.

30 Un aspecto de las enseñanzas en el presente documento contempla un procedimiento para aislar y ensayar el ADN fetal libre en el plasma materno. El procedimiento puede realizarse en una única muestra o en una multitud de muestras (por ejemplo, en una placa de múltiples pocillos). El procedimiento puede incluir el contacto de la muestra de plasma materno con un agente protector. El agente protector puede incluir un fijador como se ha indicado



anteriormente, de manera que las células maternas permanezcan intactas durante todo el procedimiento de extracción de sangre y aislamiento de ADN. El agente protector puede incluir además un inhibidor de DNasa para mantener la integridad estructural del ADN fetal. Después de poner en contacto la muestra de plasma materno con el agente protector, la muestra puede centrifugarse para separar el plasma, y el sobrenadante se desecha. Mediante el contacto de una muestra de sangre materna con el agente protector, la muestra de sangre no necesariamente requiere un tratamiento inmediato y puede almacenarse durante un período prolongado, tal como hasta aproximadamente 14 días o más a temperatura ambiente. De este modo, las invenciones contemplan una o más etapas de almacenamiento y/o espera de otro modo durante un periodo relativamente largo desde el momento de la extracción y/o puesta en contacto con la sangre hasta el momento de la selección, ensayo u otro análisis. Una vez que se procede a la determinación de la muestra, se puede añadir una concentración apropiada de un agente para inducir la precipitación (por ejemplo, una composición de sal y/o alcohol) para precipitar el material que contiene ADN fetal. Puede añadirse un compuesto orgánico u otro compuesto tal como un derivado de fenol o similar para eliminar cualquier resto de contaminantes proteínicos. Cualquier contaminante de proteína que aún permanece puede eliminarse añadiendo cantidades adicionales de un compuesto orgánico u otro compuesto tal como un derivado de fenol o similar. Después de la centrifugación, se puede añadir etanol y la muestra se centrifuga de nuevo. Cualquier líquido restante puede ser eliminado de la muestra de manera que sólo quedará el ADN fetal. El producto acabado de ADN fetal aislado puede ponerse entonces en contacto con un tampón.

Puede realizarse una o más etapas de incubación. La incubación puede ocurrir en hielo o en cualquier temperatura entre -30 °C y 70 °C. Por ejemplo, se puede incubar una muestra a aproximadamente -20 °C. Una muestra también se puede almacenar a temperatura ambiente y por lo tanto sustancialmente libre de congelación al extraer sangre.

La centrifugación se puede realizar a una velocidad adecuada. Por ejemplo, la centrifugación puede hacerse de aproximadamente 500 a aproximadamente 20.000 rpm. La centrifugación puede ocurrir de aproximadamente 1.000 a 16.000 rpm. La centrifugación se puede realizar aproximadamente a temperatura ambiente o más fría. Por ejemplo, se puede realizar a aproximadamente 1-20 °C, o aún más específicamente, a aproximadamente 4-9 °C. A continuación se ilustra cómo un dispositivo de recogida de sangre de acuerdo con las enseñanzas presentes, puede conservar el ADN sin células fetales y ayudar a minimizar el fondo de ADN sin células en el plasma materno a temperatura ambiente. Como se verá, se extraen muestras de sangre de donantes embarazadas sanas en (i) tubos convencionales de recogida de sangre con K<sub>3</sub>EDTA (comercializados con el nombre de BD Vacutainer® por Becton Dickinson de Franklin Lakes, Nueva Jersey) y (ii) tubos de recogida de sangre que contienen el agente protector que se enseña en el presente documento ("el agente protector de las presentes enseñanzas") y se mantiene a temperatura ambiente, por ejemplo, el agente protector de las presentes enseñanzas puede incluir aproximadamente 500 g/l de IDU, aproximadamente 81 g/l de EDTA tripotásico, y aproximadamente 47 g/l de glicina. El agente protector de las presentes enseñanzas puede colocarse dentro de un tubo, de modo que el tubo contenga aproximadamente 0,20 ml del agente protector. El tubo que contiene el agente protector puede recibir aproximadamente 10 ml de sangre del paciente. La sangre de paciente puede extraerse directamente en el tubo que contiene el agente protector. Se cree que los resultados mostrados variarán aproximadamente en ± 25 % de lo descrito en un intervalo de aproximadamente 300 a aproximadamente 700 g/l de IDU (con resultados similares esperados para otros liberadores de formaldehído descritos en el presente documento) y de aproximadamente 60 a aproximadamente 100 g/l de EDTA tripotásico y de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 g/l de glicina. El agente protector puede incluir aproximadamente 6 partes en peso de IDU por aproximadamente 1 parte en peso de EDTA y aproximadamente 10 partes en peso de IDU por aproximadamente 1 parte de glicina. El agente protector puede incluir aproximadamente 80 % en volumen de IDU, 12,8 % en volumen de EDTA Tripotásico y 7,25 en volumen de glicina. Un ejemplo de un tubo disponible en el comercio de acuerdo con las presentes enseñanzas, se comercializa con el nombre de Cell-Free DNA BCT en Streck, Inc., Omaha, Nebraska.

Con fines comparativos, una muestra de sangre que no se trata con las composiciones desveladas en el presente documento, se centrifuga para provocar la separación de plasma y se extrae el ADN libre (sin células). El ADN libre del plasma se cuantifica mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Estas muestras de sangre materna (extraídas en tubos convencionales con K<sub>3</sub>EDTA) muestran una reducción constante de la cantidad de ADN libre fetal durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, 36 horas, 7 días, 2 semanas, etc.) a temperatura ambiente. Por el contrario, la sangre extraída en un dispositivo que contiene el agente protector de las presentes enseñanzas, no muestra ningún cambio en la cantidad de ADN libre fetal durante el mismo período de tiempo.

Utilizando plasma materno almacenado en un dispositivo que contiene el agente protector de las presentes enseñanzas durante un período prolongado, el ADN libre fetal puede amplificarse al menos 10 veces (por ejemplo, 80 veces) usando la amplificación del genoma completo al final del período extendido, y hay suficiente cantidad de ADN disponible para un análisis significativo. Por lo tanto, el uso del agente protector de las presentes enseñanzas permite conservar el ADN libre fetal durante tiempos prolongados, así como minimizar cualquier fondo de ADN libre materno tras la recogida de muestras. El ADN libre fetal preservado de esta manera puede amplificarse mediante la tecnología de amplificación del genoma entero para producir cantidades suficientes de ácidos nucleicos fetales como material de partida para pruebas de diagnóstico prenatal basadas en ácidos nucleicos.

Para el siguiente análisis, se contempla un protocolo que emplea algunas o todas las etapas siguientes, después de la extracción directa de una muestra de sangre en un tubo de recogida de sangre evacuada. De acuerdo con la presente invención, la muestra de sangre puede ponerse en contacto con un agente protector tal como los agentes

protectores descritos en el presente documento. El procesado de ácidos nucleicos para análisis puede incluir una etapa de purificación de los ácidos nucleicos y de amplificación de los ácidos nucleicos.

Las muestras de la sangre tratada (por ejemplo, alícuotas de sangre de un milímetro y medio) se pueden retirar de cada tubo periódicamente; el ADN libre en el plasma puede purificarse; se pueden preparar cebadores y sondas para la cuantificación en tiempo real de PCR de una o más secuencias de anticuerpos o proteínas (por ejemplo,  $\beta$ -actina, SRY, RASSF1A y/u otros marcadores para ADN fetal); puede realizarse la cuantificación en tiempo real de PCR de una o más secuencias de anticuerpo o proteína (por ejemplo,  $\beta$ -actina, SRY, RASSF1A y/u otros marcadores para ADN fetal); el ADN de plasma re-suspendido puede tratarse con una enzima de restricción; puede usarse una secuencia de región promotora (tal como las asociadas con los marcadores de ADN fetal discutidos en el presente documento) como un marcador universal para ADN fetal; se puede usar un amplificador adecuado para amplificar el ADN fetal libre en plasma obtenido a partir de sangre materna almacenada en el dispositivo de las presentes enseñanzas; o se puede realizar un análisis estadístico.

Se pueden preparar cebadores y sondas para la cuantificación mediante PCR en tiempo real de ciertas secuencias de anticuerpos o proteínas indicados en el presente documento (por ejemplo,  $\beta$ -actina, RASSF1A y/u otros marcadores para el ADN fetal) de acuerdo con las enseñanzas de las técnicas reveladas, tal como describen Chan y col. *Clinical Chemistry* 52: 2211-2218 (2006) (incorporado por referencia). Pueden prepararse cebadores para la región de determinación del sexo en cromosomas Y (SRY) de acuerdo con las enseñanzas de las técnicas reveladas, tal como Lee y col., *Blood* 93: 3127-3139.

Un ejemplo de sonda que se puede utilizar para la cuantificación de la secuencia de SRY es 6FA-ATG GCT CTA GAG AAT CCC AGA ATG CGA AAC TCA GAG A-TAMAR. Los cebadores, las sondas y la mezcla maestra de PCR, están disponibles en el comercio (por ejemplo, la mezcla maestra de PCR TaqMan® Universal) y pueden adquirirse en Applied Biosystems, Foster City, CA. Las construcciones de ADN de plásmido pueden prepararse de manera que cada una contenga una única copia de las secuencias de anticuerpo o proteína indicadas en la presente invención ( $\beta$ -actina, RASSF1A, SRY y/u otros marcadores de ADN fetal). Estas construcciones de plásmido se pueden usar para trazar las curvas patrón.

Después de la resuspensión del ADN plasmático, el plasma puede tratarse con una enzima de restricción (por ejemplo, 25 U de la enzima de restricción BstUI, disponible en New England Biolabs, Ipswich, MA) de acuerdo con las enseñanzas de las invenciones reveladas, tal como describen Chan y col. (2006).

Después de la resuspensión, se puede usar un amplificador adecuado (por ejemplo, un kit de amplificación de genoma completo QIAGEN REPLI-g® UltraFast Mini disponible en QIAGEN, Inc., Valencia, California) para la etapa de amplificación del ADN fetal libre en plasma obtenido de la sangre materna que está almacenada en el dispositivo de las presentes enseñanzas. El ADN libre purificado se prepara a partir de un volumen de plasma (por ejemplo, al menos aproximadamente 100  $\mu$ l, o menos de aproximadamente 800  $\mu$ l) como se describe anteriormente, pero se resuspende en un pequeño volumen (por ejemplo, al menos aproximadamente 0,05  $\mu$ l, o menos de aproximadamente 10  $\mu$ l) y se amplifica usando el kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la amplificación, la muestra puede diluirse (por ejemplo, aproximadamente 25 veces) antes del análisis por PCR.

Para comparar la capacidad protectora de las composiciones desveladas en el presente documento, los tubos convencionales de recogida de sangre con  $K_3$ EDTA se comparan con los tubos que contienen el agente protector de las presentes enseñanzas, que por lo tanto contienen una composición que estabiliza las células sanguíneas nucleadas e inhibe las nucleasas del plasma. En los ejemplos y resultados que se analizan a continuación, el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa informático disponible en el sitio web Tools for Science of the Physics Department College of Saint Benedict Saint John's University, St. Joseph, Minnesota (<http://www.physics.csbsju.edu/>). Se empleó el ensayo de la t de Student para muestras relacionadas y se consideró un valor de  $P < 0,05$  como estadísticamente significativo.

#### 45 Ejemplo 1

Las muestras de sangre se toman de una mujer donante y de un hombre donante. La muestra de sangre de la mujer se transfiere en dos tubos, un tubo A que contiene aproximadamente 500 g/l de IDU, aproximadamente 80 g/l de EDTA tripotásico y aproximadamente 50 g/l de glicina, y un tubo B que contiene sólo el EDTA tripotásico. Ambos tubos se almacenan a temperatura ambiente. Los glóbulos blancos de la muestra de sangre del hombre se aíslan y se introducen en el tubo A y el tubo B. Se toman 3 ml de sangre de cada tubo el día 0, el día 1, el día 2, el día 3, el día 4, el día 7 y el día 11. Cada muestra se centrifuga a 800 g a temperatura ambiente durante 10 minutos y la capa superior de plasma se transfiere a un nuevo tubo y a continuación se centrifuga a 1500 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. El ADN circulante libre en cada tubo se purifica después utilizando el kit NucleoSpin® Plasma XS disponible en Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, Pennsylvania. Después, las muestras se amplifican mediante amplificación por PCR en tiempo real de un fragmento del cromosoma Y (utilizando reactivos de SuQ permix de SYQ Green SYQ disponibles en BIO-RAD Laboratories (Hercules, California)). Cualquier rotura de los glóbulos blancos masculinos durante el procedimiento de muestreo hará que el ADN cromosómico Y sea detectable dentro de la muestra de sangre de la mujer. El tubo A no muestra presencia de ADN cromosómico Y dentro de la muestra de plasma, mientras que la cantidad de ADN cromosómico Y identificado en el tubo B aumenta en cada medición,

indicando rotura de glóbulos blancos masculinos en el tubo B. Los resultados esperados de este ejemplo se muestran de manera gráfica en la figura 2, y confirman que el uso de las composiciones desveladas en el presente documento puede impedir sustancialmente la lisis de las células sanguíneas introducidas en las muestras.

### Ejemplo 2

5 Las muestras de sangre del mismo donante se extraen en dos tipos de tubos distintos de recogida de sangre. Un tubo contiene 500 g/l de IDU, 81 g/l de EDTA tripotásico y 47 g/l de glicina. El otro tubo contiene sólo heparina. Todas las muestras se centrifugan a 2100 g durante 30 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. A continuación, el plasma se transfiere a nuevos tubos y después el ADN no humano ( $\lambda$ ) se introduce en los tubos de plasma. Las muestras a las que se les ha introducido el ADN no humano se almacenan después a temperatura ambiente durante 0, 1, 2, 3, 4, 7, 11 y 14 días. El ADN circulante libre se purifica usando el Mini kit QIAamp® DNA Blood disponible en QIAGEN Inc. (Valencia, CA). El ADN se extrae de cada muestra de plasma. A continuación, las muestras se amplifican mediante PCR cuantitativa (utilizando los reactivos iQ SYBR Green Supermix disponibles en BIO-RAD Laboratories (Hercules, California)) para identificar la cantidad de ADN  $\lambda$  presente. Los resultados muestran un porcentaje relativo consistente de la presencia de ADN  $\lambda$  en cada medida, indicando poca o ninguna disminución en el porcentaje de ADN sin células en las muestras de plasma contactadas tanto por IDU como por EDTA tripotásico. La cantidad de ADN  $\lambda$  disminuye en cada medición consecutiva en aquellas muestras en contacto con sólo Heparina, lo que indica una disminución gradual en el porcentaje relativo de ADN libre. Los resultados esperados de este ejemplo se muestran de forma gráfica en la Figura 3. Este ejemplo confirma que las composiciones de la presente invención son capaces de mantener la integridad y la cantidad de ADN presentes en una muestra de sangre.

### Ejemplo 3

Se extraen dos muestras de sangre materna del mismo donante en dos tubos distintos de recogida de sangre. Un tubo contiene aproximadamente 500 g/l de IDU, aproximadamente 80 g/l de EDTA tripotásico y aproximadamente 50 g/l de glicina. El otro tubo contiene solamente el EDTA tripotásico. Ambos tubos se almacenan a temperatura ambiente y se retiran alícuotas de 1 ml de sangre de cada tubo el día 0, el día 7 y el día 14 y se separa el plasma. Todas las muestras se centrifugan a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. El plasma se transfiere después a nuevos tubos y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El ADN circulante libre se purifica usando el kit NucleoSpin® Plasma XS disponible en Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, Pensilvania. El ADN se extrae de cada muestra de plasma y se eluye en 60  $\mu$ l de tampón de elución. Se digiere una cantidad de 32  $\mu$ l de ADN eluido con 40 U de enzima BstU I a 60 °C durante 6 horas. Las muestras se amplifican a continuación mediante PCR en tiempo real (usando los reactivos de PCR TaqMan® RT disponibles en Applied Biosystems, Foster City, California) usando cebadores para la región promotora de RASSF1A. Los resultados muestran un porcentaje relativo consistente de la presencia de RASSF1A en cada medición, indicando poca o ninguna disminución en el porcentaje de ADN libre fetal en las muestras de plasma materno puestas en contacto con IDU y EDTA tripotásico. La cantidad de RASSF1A disminuye en cada medición consecutiva en aquellas muestras en contacto con solamente el EDTA tripotásico, lo que indica una disminución gradual del porcentaje relativo de ADN libre fetal. Los resultados de este ejemplo se muestran en formato gráfico en la Figura 4.

La Figura 5 muestra el resultado esperado de la incubación *ex vivo* de sangre materna cuando se extrae en tubos convencionales con K<sub>3</sub>EDTA sobre la concentración de ADN libre en plasma. Inicialmente (3 horas), se descubrió que la concentración media de ADN libre era de 762 equivalentes de genoma por ml de plasma (GE / ml), la cual aumentó notablemente con el tiempo. En comparación con el valor inicial de 3 horas, se observan aumentos estadísticamente significativos en la concentración de ADN libre a las 24 h (P <0,05), 48 h (P <0,05), 72 h (P <0,05), 7 días (P <0,05) y 14 días (P <0,001). Este aumento constante podría reflejar la lisis de células sanguíneas nucleadas y la liberación posterior de ADN genómico celular en el plasma que continuó durante 14 días. La Figura 6 ilustra el efecto esperado de la incubación *ex vivo* de sangre materna extraída en tubos que contienen el agente protector de las presentes enseñanzas sobre la concentración de ADN libre en plasma. En este caso, una concentración media inicial de ADN libre de 672 GE/ml no aumenta significativamente a lo largo de todo el período experimental de 14 días, lo que indica que se observa una integridad mejorada de las células sanguíneas nucleadas. Después de 3 horas de incubación, una comparación de la concentración de ADN libre plasmático entre los tubos con K<sub>3</sub>EDTA y los tubos que contenían el agente protector de las presentes enseñanzas, mostró una diferencia estadísticamente significativa (P <0,05). La concentración media significativa de ADN libre en tubos con K<sub>3</sub>EDTA es de 6341 GE/ml mientras que es de 680 GE/ml en aquellos tubos que contienen el agente protector de las presentes enseñanzas. La mayor concentración de ADN libre plasmático en el tubo con K<sub>3</sub>EDTA en comparación con los tubos que contenían el agente protector de las presentes enseñanzas indica que el ADN celular se libera en el plasma mediante lisis de células sanguíneas nucleadas.

La figura 7 muestra el efecto esperado de la incubación *ex vivo* en el ADN libre fetal en plasma materno en tubos de recogida de sangre con K<sub>3</sub>EDTA. Se observa una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de ADN libre fetal. Esta tendencia a la baja en los valores medianos del porcentaje de ADN libre fetal (4,05, 1,33, 0,45, 0,11, 0,10 y 0,023 a las 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 días y 14 días, respectivamente), demuestra que los tubos con K<sub>3</sub>EDTA no pueden mantener el porcentaje de ADN libre fetal en el plasma materno a un nivel constante.

La figura 8 muestra el efecto esperado de la incubación *ex vivo* en el ADN libre fetal en el plasma materno cuando se pone en contacto con el agente protector de las presentes enseñanzas. En este caso, el porcentaje de ADN libre no cambia significativamente en la tendencia de los valores medianos; (6,8, 5,5, 6,2, 6,1, 6,8 y 6,5 a las 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 días y 14 días, respectivamente).

5 En otras pruebas, el plasma de donante que había dado positivo en el cromosoma Y (datos no mostrados) se utilizó para la amplificación del genoma completo (WGA). Mediante PCR en tiempo real, se detectaron 398 copias de SRY de ADN sin la WGA, mientras que se detectaron 32.300 copias de ADN de SRY tras la WGA. Esto representa el enriquecimiento en ADN fetal libre en, al menos, aproximadamente 10 veces, 20 veces, 40 veces o incluso 80 veces a partir del plasma materno que se había almacenado en un dispositivo que contenía el agente protector de las presentes enseñanzas a temperatura ambiente durante el mismo período (por ejemplo, 2 semanas) (figura 9).

10 Como se ha comentado en referencia a la figura 5, la sangre materna recogida en tubos convencionales con K<sub>3</sub>EDTA muestra un aumento de 7 veces y 98 veces en el ADN total libre en plasma materno a las 24 horas y 14 días en comparación con 3 horas, respectivamente. Sin embargo, la concentración total de ADN libre es constante a temperatura ambiente durante hasta 14 días en sangre materna puesta en contacto con el agente protector de las presentes enseñanzas (Figura 6). Sin pretender estar limitado por la teoría, esto indica que los productos químicos presentes en el agente protector de las presentes enseñanzas son capaces de fijar las células sanguíneas nucleadas evitando con ello la liberación del ADN genómico celular en plasma mediante la apoptosis, la muerte celular y la lisis celular. Una comparación de las concentraciones de ADN totales libres de células entre K<sub>3</sub>EDTA y el dispositivo de las presentes enseñanzas en el momento inicial (3 horas) muestra una diferencia estadísticamente significativa. La concentración total de ADN sin células en el tubo con K<sub>3</sub>EDTA a las 3 horas es de 6341 GE/ml, mientras que en un tubo que contiene el agente protector de las presentes enseñanzas, es sólo de 680 GE/ml. Este aumento múltiple (por ejemplo, 9 veces) en la concentración total de ADN libre en las muestras contactadas sólo por K<sub>3</sub>EDTA en comparación con muestras puestas en contacto con el agente protector de las presentes enseñanzas puede resultar de una mayor liberación de ADN genómico celular por la apoptosis de células sanguíneas nucleadas, muerte celular y lisis durante la incubación *ex vivo* después de la extracción de sangre y el procesado de las muestras, y se puede evitar sustancialmente mediante el uso de las enseñanzas del presente documento.

15 La figura 7 muestra el efecto esperado de la incubación *ex vivo* (de sangre extraída en tubos con K<sub>3</sub>EDTA) sobre el porcentaje de ADN libre fetal en el plasma sanguíneo materno. Hay una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de ADN libre fetal en el tiempo. El principal contribuidor a esta disminución constante en el porcentaje de ADN libre fetal puede ser el aumento del ADN libre materno de fondo, ya que puede producirse una degradación del ADN libre fetal debido a la acción de la nucleasa. Por el contrario, como se muestra en la figura 8, el porcentaje de ADN libre fetal de la sangre materna que está en contacto con el agente protector de las presentes enseñanzas puede ser sustancialmente constante a lo largo del tiempo a temperatura ambiente. Se cree que este efecto protector puede ser el resultado de las sustancias químicas presentes en el agente protector de las presentes enseñanzas, que estabilizan las células sanguíneas, previniendo la liberación de ADN celular, así como la actividad inhibidora de la nucleasa, que protege al ADN fetal libre de la degradación. Por lo tanto, las enseñanzas contemplan el tratamiento de una muestra de tal manera que limita los efectos perjudiciales de la DNasa y la RNasa sobre los ácidos nucleicos fetales presentes en el plasma.

20 Como se pone de manifiesto con los ejemplos y con los resultados de las pruebas desvelados en el presente documento, el ADN libre fetal encontrado en el plasma sanguíneo materno es una valiosa fuente para el diagnóstico prenatal no invasivo. Sin embargo, un factor importante que limita el uso efectivo de ADN libre fetal en pruebas prenatales basadas en ácidos nucleicos, es que la concentración total de ADN presente en el plasma materno proviene en gran medida de la propia madre. Por lo tanto, las muestras pueden no tener ADN libre atribuible a la apoptosis, la muerte celular y la lisis de las células sanguíneas maternas nucleadas. Este puede ser el caso después de aproximadamente 4 horas de extracción de sangre, 6 horas de extracción de sangre, o incluso 24 horas de extracción de sangre.

25 Cuando se ve comprometida la integridad de un marcador de ADN, la secuencia de ADN no puede amplificarse. Dado que muchos de los diagnósticos prenatales basados en ADN dependen de la amplificación posterior de ADN, es importante proteger la integridad de los marcadores de ADN raros, tales como los de ADN libre fetal, durante todo el procedimiento previo al análisis. Aquí, el porcentaje de ADN libre fetal se determina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La figura 8 muestra que el porcentaje de ADN libre fetal se mantiene sustancialmente constante durante hasta 14 días y proporciona pruebas de que el agente protector de las presentes enseñanzas puede proteger la integridad del ADN libre fetal a temperatura ambiente durante hasta 14 días.

30 Uno de los factores que limitan el uso de ADN libre fetal en el plasma materno en el diagnóstico prenatal no invasivo, es su bajo nivel relativo en el plasma materno. Por lo tanto, el ADN libre fetal se amplifica en el plasma materno mediante la amplificación del genoma completo (WGA). Se identifica el feto masculino de una donante en su primer trimestre de embarazo mediante la amplificación de región de secuencia SRY del cromosoma Y. La amplificación del ADN libre en plasma obtenida de esta donante mediante WGA y la posterior detección de la región de secuencia SRY por PCR a tiempo real muestra un incremento múltiple (por ejemplo, al menos 10, 20, 40 o aproximadamente 80 veces) de la concentración de ADN libre fetal (figura 9). Cuando el ADN libre, aislado de la sangre para la WGA, se pone en contacto con el agente protector de las presentes enseñanzas y se almacena a temperatura ambiente

durante 14 días, se espera que los resultados proporcionen pruebas contundentes de que el agente protector de las presentes enseñanzas sea capaz de preservar la integridad de moléculas grandes de ADN fetal libre que se requieren para la WGA.

5 Esta nueva metodología puede utilizarse para evitar muchos problemas pre-analíticos existentes que pueden afectar a la detección de ADN fetal libre en la sangre materna. Dado que el agente protector de las presentes enseñanzas estabiliza las células sanguíneas nucleadas e inhibe a las nucleasas del plasma, es posible almacenar muestras de sangre materna en un dispositivo que contenga el agente protector de las presentes enseñanzas a temperatura ambiente durante hasta 14 días sin ningún aumento de la concentración de ADN libre materno de fondo y sin ninguna alteración de la integridad del ADN libre. Los procedimientos en el presente documento contemplan tal almacenamiento. Los procedimientos en el presente documento también contemplan el uso del dispositivo de las presentes enseñanzas para extraer sangre materna para el diagnóstico prenatal no invasivo cuando la extracción de sangre y los ensayos con ácidos nucleicos no se realizan en el mismo lugar. Los procedimientos en el presente documento, por tanto, pueden carecer de cualquier etapa de separación inmediata del plasma tras la extracción de sangre, congelación del plasma (por ejemplo, a -80 °C) o ambas, para el envío. Los procedimientos en el presente documento también pueden obviar el uso de perlas magnéticas o partículas de cualquier tipo. Los procedimientos en el presente documento pueden carecer de cualquier adición de formaldehído a las muestras de sangre de forma inmediata tras la extracción de sangre.

20 Los ejemplos y resultados de ensayo indicados anteriormente demuestran un efecto sinérgico inesperado que se produce únicamente en las muestras de sangre que se han puesto en contacto tanto con un fijador como con un anticoagulante, o más específicamente, con IDU, EDTA y glicina. Las muestras de sangre materna que se han puesto en contacto solo con un fijador o solo con un anticoagulante no muestran la capacidad de mantener la integridad de las células sanguíneas maternas o la integridad de los ácidos nucleicos fetales. El efecto combinado de IDU, EDTA y glicina supera con creces cualquier expectativa basada en el efecto, o ausencia del mismo, del uso solo de IDU o EDTA o glicina.

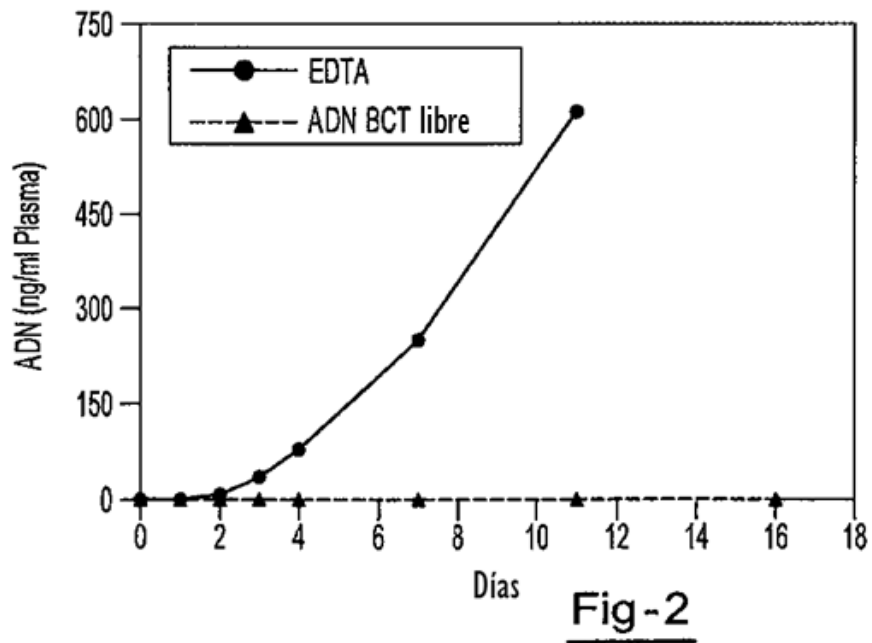
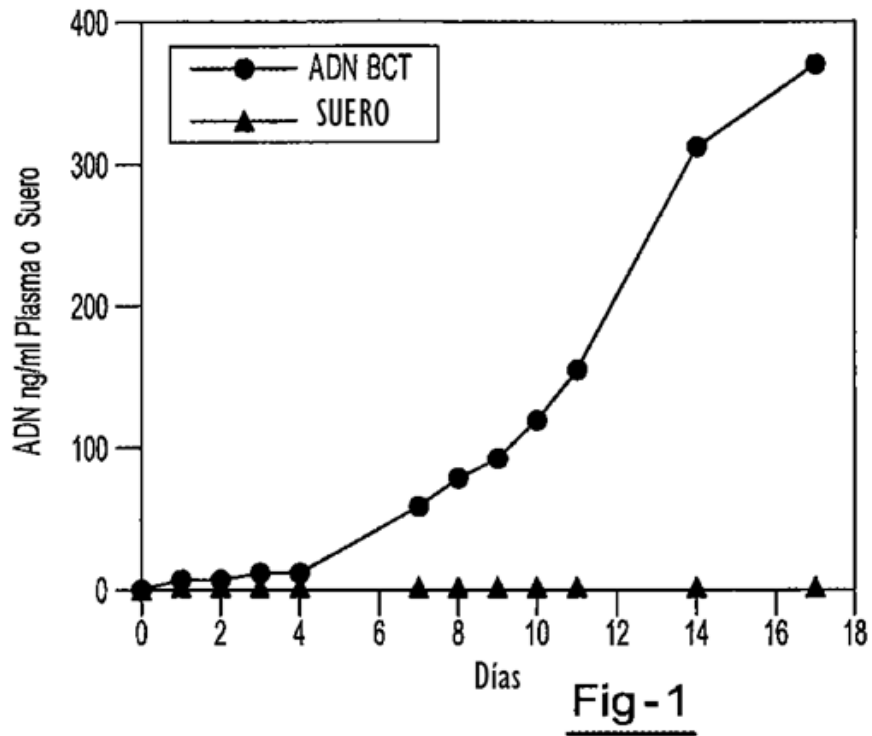
25 Se apreciará que pueden emplearse las concentraciones o diluciones de las cantidades mencionadas en el presente documento. En general, las proporciones relativas de los componentes mencionados en el presente documento continuarán siendo iguales. En general, las proporciones relativas de los componentes mencionados seguirán siendo las mismas. Por lo tanto, como ejemplo, si en las enseñanzas se requieren 30 partes en peso de un componente A, y 10 partes en peso de un componente B, el experto en la técnica reconocerá que tales enseñanzas también constituyen una enseñanza del uso del componente A y del componente B en una proporción relativa de 3:1. Las enseñanzas de las concentraciones en los ejemplos pueden variar dentro de aproximadamente el 25 % (o superior) de los valores indicados y se esperan resultados similares. Además, tales composiciones de los ejemplos se pueden emplear con éxito en los presentes procedimientos para aislar ácidos nucleicos fetales (por ejemplo, ADN libre fetal).

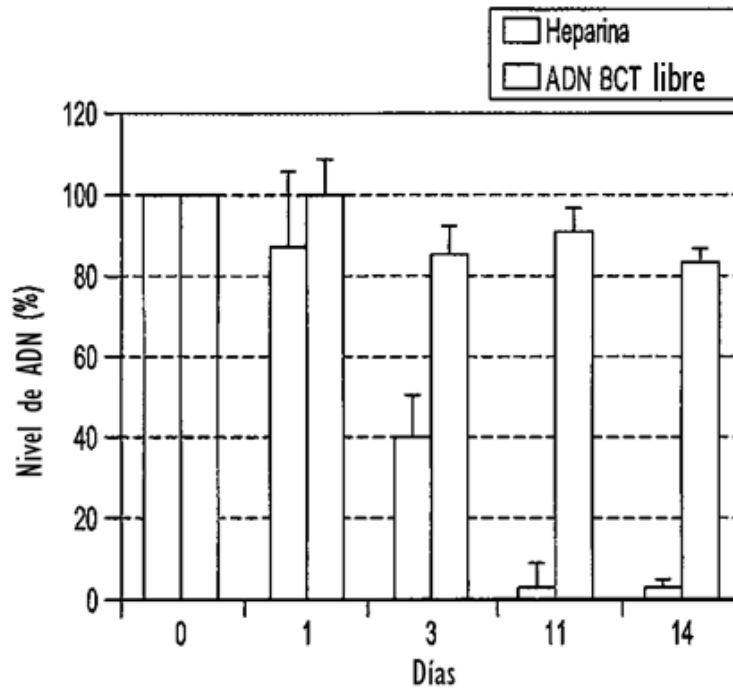
35 Se apreciará que lo anterior es solo a modo ilustrativo. Se pueden emplear otros componentes en cualquiera de las composiciones desveladas en el presente documento, según se desee, para conseguir las características resultantes deseadas. Como ejemplos de otros componentes que pueden emplearse se incluyen antibióticos, anestésicos, antihistamínicos, conservantes, tensioactivos, antioxidantes, ácidos biliares no conjugados, antifúngicos, ácidos nucleicos, ajustadores de pH, ajustadores de osmolaridad, o cualquier combinación de los mismos.

40 Las explicaciones e ilustraciones presentadas en el presente documento pretenden familiarizar a otros expertos en la técnica con la invención, sus principios, y su aplicación práctica. Estos expertos en la técnica pueden adaptar y aplicar la invención de numerosas formas, como pueda ser la más adecuada para los requisitos de un uso en particular. Por consiguiente, las realizaciones específicas de la presente invención, tal como se han expuesto, no pretenden ser exhaustivas o limitantes de la invención. Por lo tanto, el alcance de la invención debe determinarse no con referencia a la descripción anterior, sino que debe determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

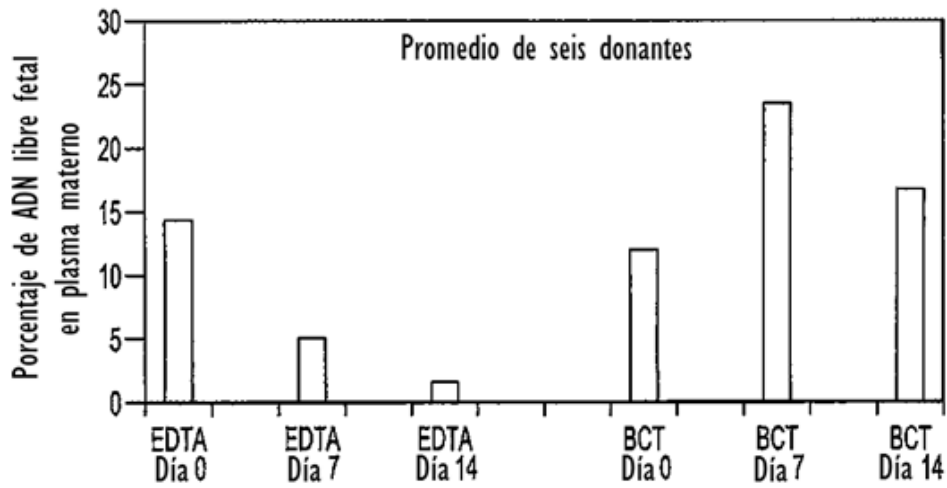
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento exploratorio no invasivo prenatal para la identificación de características fetales, que comprende las etapas de:
- 5 poner en contacto una muestra de sangre materna extraída, que incluye una pluralidad de células sanguíneas, con un agente protector de ácido nucleico, para evitar que las células sanguíneas (i) liberen ácidos nucleicos genómicos a la muestra de sangre y (ii) experimenten una actividad nucleasa que degrade los ácidos nucleicos fetales;
- 10 aislar los ácidos nucleicos fetales de la muestra de sangre materna; y  
analizar los ácidos nucleicos fetales aislados para identificar una característica fetal en el que el agente protector incluye glicina e imidazolidinil urea, y ácido etilendiaminotetraacético en el que el agente protector contiene menos del 1 % en peso de formaldehído.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad de agente conservante es menor de aproximadamente 20 mg/ml de la muestra de sangre.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la etapa de aislamiento tiene lugar al menos 7 días después de la extracción de la muestra de sangre, y sin congelar las muestras de sangre, preferentemente a una temperatura inferior a aproximadamente -30 °C, más preferentemente inferior a aproximadamente -70 °C.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de análisis tiene lugar al menos 7 días después de la extracción de la muestra de sangre, sin congelar la muestra de sangre.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4, en el que la etapa de aislamiento tiene lugar al menos 14 días después de la extracción de sangre, y sin congelar la muestra de sangre, preferentemente a una temperatura inferior a aproximadamente -30 °C, más preferentemente inferior a aproximadamente -70 °C.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la etapa de análisis tiene lugar al menos 14 días después de la extracción de la muestra de sangre, sin congelar la muestra de sangre.
- 25 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de análisis, la etapa de aislamiento, o ambas, incluye una etapa de poner en contacto el ácido nucleico fetal con una enzima.



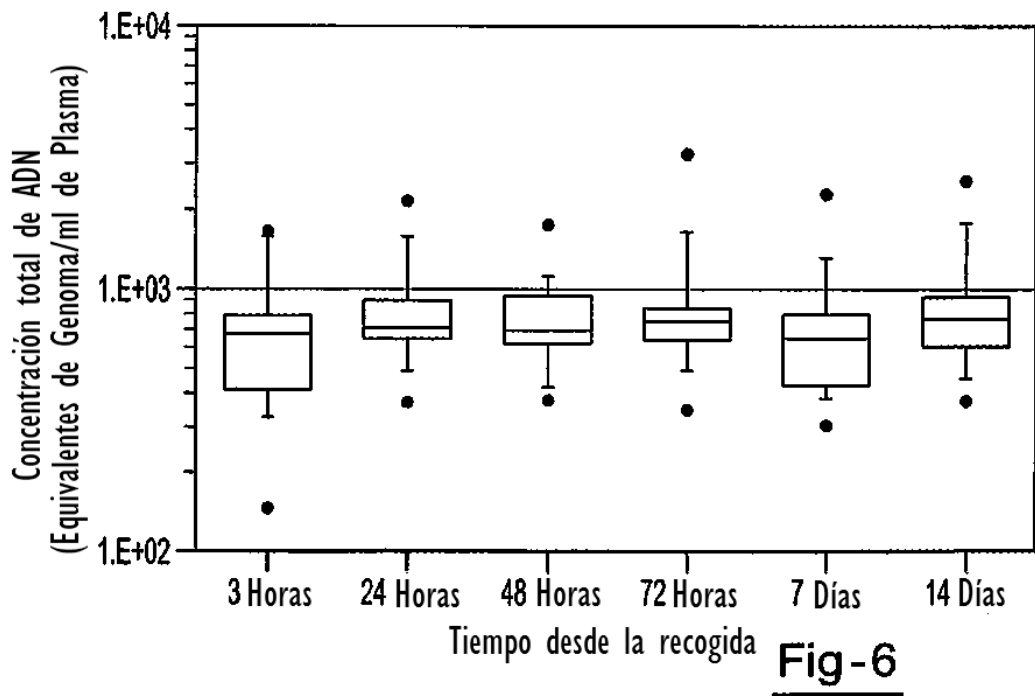
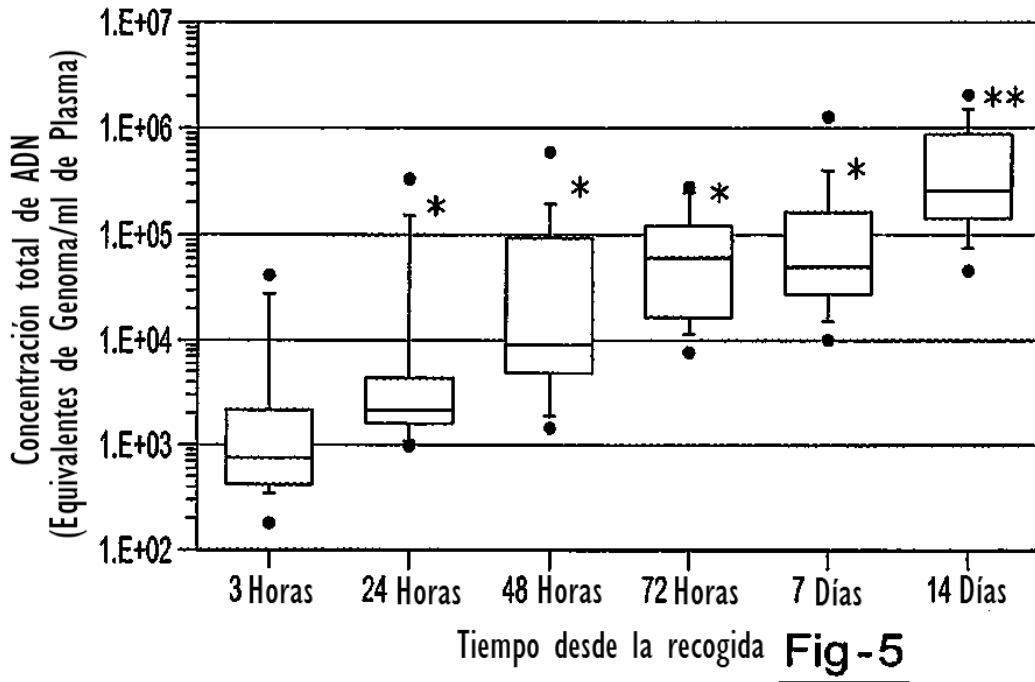


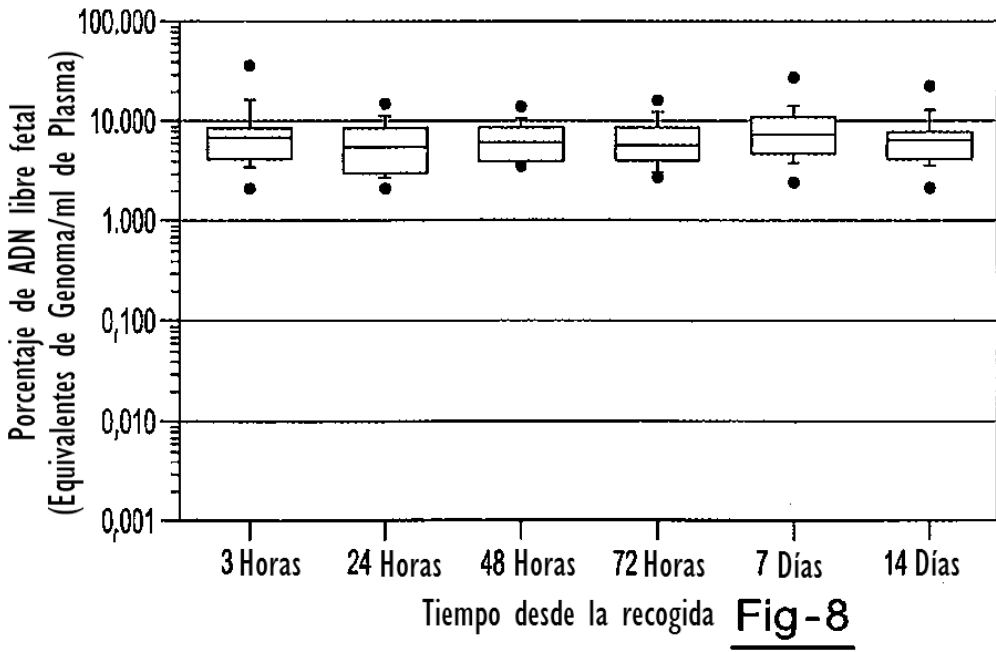
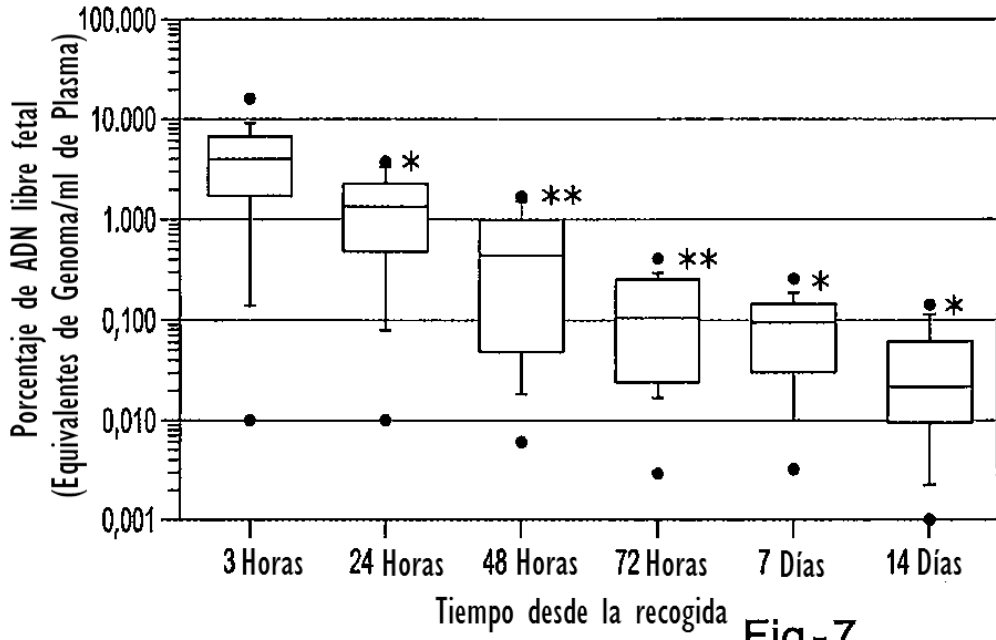
**Fig-3**

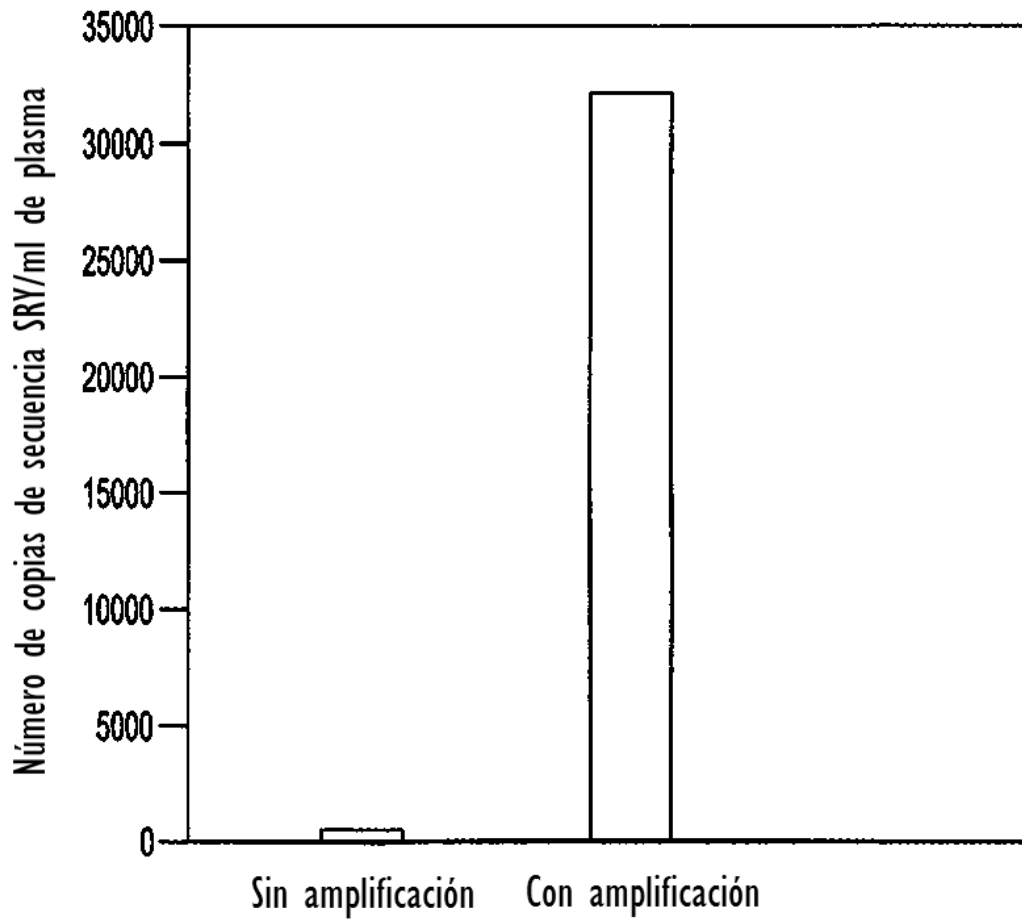


**Fig-4**









**Fig-9**