

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 799**

51 Int. Cl.:

G01N 33/80

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014** **PCT/EP2014/058311**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014** **WO14173997**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014** **E 14728460 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017** **EP 2989469**

54 Título: **Método no invasivo para el diagnóstico prenatal**

30 Prioridad:

24.04.2013 IT MI20130683

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

06.11.2017

73 Titular/es:

**FONDAZIONE IRCCS "CA' GRANDA - OSPEDALE
MAGGIORE POLICLINICO" (100.0%)**

**Via Francesco Sforza, 28
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

LATTUADA, DEBORA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 799 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

Método no invasivo para el diagnóstico prenatal

Campo de la invención

La invención se refiere a un método no invasivo que permite el aislamiento y la provisión de eritroblastos fetales intactos, que son útiles para los estudios posteriores de cromosomas, y de expresión de genes y proteínas para el diagnóstico prenatal factible en todas las etapas gestacionales.

Estado de la técnica

El diagnóstico prenatal de las anomalías cromosómicas y de las enfermedades genéticas requiere necesariamente una fuente fetal de ADN o de cromosomas.

- 10 Las anomalías cromosómicas afectan a 9 de cada 1000 recién nacidos vivos, con una incidencia más elevada si la edad de la madre es avanzada (1/80 para las madres que han alcanzado los 40 años de edad).

En cambio, con respecto a las anomalías genéticas, la investigación está en continuo desarrollo y cada vez hay un mayor número de enfermedades identificables, tales como la fibrosis quística, la anemia drepanocítica y el síndrome de Duchenne. A medida que avanzan los conocimientos sobre las secuencias genómicas, se espera que el número de estas enfermedades genéticas crezca sustancialmente. Su incidencia relativa también varía de acuerdo con determinadas cepas fenotípicas y áreas geográficas.

Ya están consolidadas pruebas de detección prenatales no invasivas o invasivas para identificar las posibles anomalías cromosómicas y enfermedades genéticas.

- 20 Los análisis no invasivos que se conocen hasta la fecha consisten en pruebas basadas en análisis morfológicos (p. ej., ecografía de translucidez nuchal) y hematoquímicos (prueba doble y prueba triple con la sangre materna) que no entrañan ningún riesgo para la madre ni para el niño, si bien tienen un grado relevante de aproximación (también denominado «dependiente del operario»). Por desgracia, los análisis no invasivos conocidos hasta la fecha tienen la desventaja de ser incapaces de ofrecer un resultado claro y seguro, y no permiten la identificación clara de una disfunción. Con estos análisis, sólo se puede realizar una investigación preliminar.

- 25 En cambio, las pruebas invasivas permiten analizar las anomalías cromosómicas o genéticas basándose en el análisis del ADN fetal. Consisten en pruebas diagnósticas que entrañan un riesgo importante para el feto, tales como la amniocentesis y la coriocentesis.

- 30 La amniocentesis implica la toma de muestras del líquido amniótico, que contienen células fetales que se pueden cultivar. Tal técnica es conocida desde los años 50 y se ofrece con libertad a las mujeres embarazadas a partir de los 35 años de edad o que están en situaciones con determinados riesgos.

El muestreo de vellosidades coriónicas (coriocentesis) implica la recogida de vellosidades de la cámara gestacional.

Esta técnica se conoce desde finales de los años 60 y se propone como una alternativa (menos frecuente) a la amniocentesis.

- 35 Estas dos pruebas invasivas entrañan un riesgo significativo que compromete el desarrollo correcto del embarazo con una prevalencia que supera el 1% y amplias variaciones según el contexto en el que se realizan.

La observación de que el ADN fetal está presente en la sangre materna data de 1997 (Lo Y M D et al. «Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum». *Lancet* 1997; 350: 485 e7) y muchos grupos por todo el mundo están desde entonces trabajando en el desarrollo de un método eficaz para el diagnóstico prenatal y la identificación precoz de las principales anomalías genómicas y cromosómicas en el feto.

- 40 No obstante, hasta la fecha, el análisis del ADN fetal solo posibilita la determinación del sexo del feto y del factor RhD, mientras que en 2010 se desarrolló un protocolo para la trisomía 21 (Chiu R W K y Lo Y M D «Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age». *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* xxx (2010) 1e6).

- 45 Sin embargo, hay al menos dos problemas importantes con el uso del ADN fetal en la sangre materna. El primer problema es aislar e identificar con certeza entre el ADN fetal libre en circulación y el ADN materno; el segundo problema es la fiabilidad del ADN aislado, debido al hecho de que el ADN fetal está fragmentado.

- 50 Hoy día, todavía existe la necesidad de nuevas técnicas diagnósticas no invasivas que permitan el diagnóstico correcto y exacto de las anomalías cromosómicas y de los trastornos genéticos del feto en cualquiera de las etapas gestacionales, que carezcan de riesgos para el feto o para la madre, y que al mismo tiempo sean reproducibles y ventajosas desde los puntos de vista práctico y económico.

En Choolani et al. (*Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, vol. 26, n.º 5, 1 de octubre de 2012, páginas 655-667) se describen una serie de técnicas para aislar eritrocitos nucleados del feto a partir de la sangre materna, que incluyen la centrifugación en gradientes de densidad, FACS, clasificación magnética de las células activadas, filtración en un chip, etc. En Lattuda et al. (*Anal Bioanal Chem*, vol. 405, n.º 2-3, 21 de septiembre de 2012, páginas 977-984) se describe el uso del fraccionamiento por campo gravitatorio y flujo para aislar las CEVUH desde el cordón umbilical.

Uno de los objetivos de la presente invención es dar a conocer un método para aislar las células fetales nucleadas, en particular los eritroblastos que contienen ADN intacto, de las otras células presentes en la sangre materna.

Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un método idóneo para el diagnóstico rápido y precoz de las anomalías cromosómicas y de las enfermedades genéticas del feto mediante el uso de un procedimiento no invasivo, lo que proporciona indicaciones precisas y seguras sin riesgos, y sin las desventajas mencionadas más arriba para los métodos invasivos y no invasivos conocidos.

Compendio de la invención

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para el aislamiento de eritroblastos fetales intactos a partir de una muestra de la sangre periférica de una mujer embarazada que comprende las etapas de:

- a. aplicar un flujo laminar por fraccionamiento en campo gravitatorio y flujo (GrFFF, por su nombre en inglés) a una muestra de sangre que contiene eritroblastos fetales intactos aislados; y
- b. aislar los eritroblastos fetales intactos de los otros componentes de la sangre.

También se describe, pero no se reivindica, un kit de diagnóstico para el aislamiento de eritroblastos fetales intactos a partir de la sangre periférica materna de acuerdo con el método de la presente invención, que comprende:

- una solución para la preparación de gradientes de densidad,
- una solución salina para la dilución de la muestra de sangre periférica,
- heparina; y, facultativamente, solución de lavado.

Descripción de las figuras

La invención se describirá a continuación con detalle y con referencia a las figuras adjuntas, en donde:

En la figura 1 se muestra un fracciograma representativo de una separación por GrFFF del ejemplo 4, en donde el gráfico está generado a partir del espectro de absorción a 600 nm con respecto al tiempo de separación de las células sanguíneas de una mujer embarazada de 9 semanas de gestación, separadas mediante Lympholite®. Fase móvil: solución salina complementada con heparina. Tiempo de relajación: 2 min. Velocidad de elución: 0,25 ml/min. Número de células inyectadas: 5×10^5 . Recogida de fracciones: 1000-1500 s. Las tres líneas representan tres ciclos diferentes de la misma muestra. Se pueden inferir cuatro zonas en el espectro de absorción: la zona 0, en donde se controla la estabilidad del flujo; la zona 1, también denominada de vacío (*Void*), en donde se detecta un incremento de la absorbancia con la evacuación de desechos celulares y linfocitos; la zona 2, en donde la absorbancia disminuye sin regresar al valor 0; la zona 3, en donde la absorbancia se incrementa con la evacuación de linfocitos y granulocitos;

En la figura 2 se muestra un fracciograma representativo de una separación por GrFFF del ejemplo 4, en donde el gráfico está generado a partir del espectro de absorción a 600 nm con respecto al tiempo de separación de las células sanguíneas de una mujer embarazada de 18 semanas de gestación, separadas mediante Lympholite®, en donde la fase móvil es: solución salina complementada con heparina. Tiempo de relajación: 2 min. Velocidad de elución: 0,3 ml/min. Número de células inyectadas: 6×10^5 . Recogida de fracciones: 950-1250 s. Las líneas verde, roja y azul representan tres fraccionamientos diferentes de la misma muestra. Se pueden inferir cuatro zonas en el espectro de absorción: la zona 0, en donde se controla la estabilidad del flujo; la zona 1, también denominada de vacío (*Void*), en donde se detecta un incremento de la absorbancia con la evacuación de desechos celulares y linfocitos; la zona 2, en donde la absorbancia disminuye sin regresar al valor 0; la zona 3, en donde la absorbancia se incrementa con la evacuación de linfocitos y granulocitos;

En la figura 3 se muestra una imagen de microscopia del ejemplo 5 de eritroblastos fijados en portaobjetos de vidrio mediante Cytospin y teñidos con Giemsa, a 100× aumentos;

En la figura 4 se muestra una imagen de microscopia del ejemplo 5 de eritroblastos fijados en portaobjetos de vidrio mediante Cytospin y teñidos con ortodianisidina, a 100× aumentos;

En la figura 5 se muestra un ejemplo representativo del análisis citofluorimétrico del ejemplo 6. Las células se pueden dividir en poblaciones diferentes: P1, P2, P3 y P4. P1 son todas las células, P2 son las células vivas (7AAD-PE frente a SSC), P3 son linfocitos CD45+ (CD45-PE frente a SSC), P4 son linfocitos CD45- (CD45-PE frente a

SSC). Del panel izquierdo inferior se puede inferir que las células de los grupos P3 y P4 dieron positivo o negativo para la glicoforina (Gly) y para CD71 (Gly-PE frente a 71-FITC-A). Los paneles A, B y C muestran células de la sangre materna separadas por Lympholite® y recogidas del anillo. En particular, el panel A muestra el análisis de células separadas en la zona 1, denominada VOID; el panel B muestra el análisis de las células separadas en la zona 2, denominada placa; el panel C muestra el análisis de las células separadas en la zona 3, denominada pico. La caja D muestra el análisis por FACS de las células sedimentadas en el fondo del tubo durante la separación con Lympholite®, después de la reacción hipoosmótica, denominada sedimento;

En la figura 6 se muestra una imagen del análisis por PCR en tiempo real del ejemplo 7 sobre las muestras de células fetales separadas de la sangre materna mediante el uso de GrFFF y recogidas en la zona 2. Se puede observar un incremento en la fluorescencia en tres muestras, lo que indica la presencia del cromosoma Y. La fluorescencia se incrementa también en el control positivo para el sujeto varón, mientras que no cambia para el sujeto mujer;

En la figura 7 se muestra el análisis de una muestra del ejemplo 7, hecho con las células recogidas en la zona 2 por QF-PCR (PCR con fluorescencia cuantitativa); se muestra la presencia de dos genomas diferentes, a saber, la presencia de ADN materno y de ADN fetal. En particular, es posible inferir la presencia de picos diferentes con respecto tanto a la altura como al número (tres o incluso cuatro picos), lo que proporciona la indicación de que están presentes dos genomas diferentes;

En la figura 8 se muestra un análisis del ejemplo 8 de la secuencia del ADN extraído de una muestra de sangre de una mujer embarazada portadora de hemofilia. La sangre de la mujer embarazada se procesó mediante Lympholite®, se separaron las células nucleadas por GrFFF, y se recogió una fracción muy pequeña de la parte final de la zona 2. La secuencia muestra la presencia de heterocigosidad en el ADN de la mujer embarazada (presencia de las bases A y C) y de homocigosidad en las células fetales (presencia solo de la base A) separadas por GrFFF.

Descripción detallada de la invención

Por lo tanto, la invención hace referencia a un método para el aislamiento de eritroblastos fetales intactos a partir de una muestra de sangre periférica, en particular de una mujer embarazada, que comprende las etapas de:

- a. aplicar un flujo directo laminar por fraccionamiento por campo gravitatorio y flujo (GrFFF) a una muestra de sangre que contiene eritroblastos fetales intactos aislados; y
- b. aislar los eritroblastos fetales intactos de los otros componentes de la sangre.

En la presente invención, la definición:

- «sistema de flujo laminar por fraccionamiento por campo gravitatorio y flujo (GrFFF)» hace referencia a una técnica que permite la separación de células con diferentes tamaños y formas. La muestra se introduce en un canal diseñado para permitir la aplicación de un flujo laminar que separa físicamente y permite el aislamiento de sus diferentes componentes.

Preferiblemente, el método de acuerdo con la presente invención comprende una etapa c adicional, en la que se extrae el ADN, el ARN y las proteínas de los eritroblastos fetales aislados en la etapa b.

La extracción del ADN y el ARN se puede realizar mediante diferentes protocolos experimentales. Independientemente de la técnica de extracción utilizada, esta debe cumplir dos requisitos principales: rendimiento y pureza, que quiere decir que en la solución debe estar presente el ácido nucleico a examinar y no debe haber contaminantes que se puedan fijar a los reactantes en solución y alteren los resultados de la secuenciación.

- El procedimiento de extracción y purificación implica típicamente las siguientes cuatro etapas: lisis celular, inactivación de las nucleasas celulares, separación y recuperación del ácido nucleico a partir de la solución que contiene el lisado celular, y precipitación.

La extracción de las proteínas se puede realizar por diferentes protocolos experimentales.

En una realización, el método de acuerdo con la presente invención es un método diagnóstico.

- En una realización preferida, de acuerdo con el método de la presente invención, la muestra de sangre periférica se trata con una solución para la preparación de los gradientes de densidad antes de aplicar el flujo laminar a la muestra.

El Ficoll™ es un ejemplo de solución para la preparación de gradientes de densidad. El Ficoll™ es un copolímero ramificado, sintético, hidrosoluble y de peso molecular muy elevado, que se sintetiza a partir de sacarosa y epiclorohidrina, que se utiliza para preparar gradientes de densidad para la separación de células.

En el método de acuerdo con la presente invención, la muestra de la sangre periférica se toma ventajosamente a partir de la octava a la vigesimosegunda semana de gestación.

En algunas realizaciones del método de la presente invención, el flujo laminar aplicado a la muestra de sangre que contiene eritroblastos fetales intactos es un flujo con una velocidad que oscila de aproximadamente 100 µl/min a aproximadamente 1 ml/min, preferiblemente una velocidad de flujo de 250 µl/min.

- 5 En algunas realizaciones, el método de acuerdo con la presente invención implica un flujo laminar en el que dicho flujo laminar se aplica a una muestra que tiene una concentración que oscila de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^6 células en 50 µl, preferiblemente aproximadamente 5×10^5 células en 50 µl.

De acuerdo con otras realizaciones del método de acuerdo con la presente invención, dichos eritroblastos fetales se aíslan en un tiempo de elución que oscila de 5 minutos a 40 minutos.

- 10 En una realización del método de la presente invención, dichos eritroblastos fetales aislados se utilizan para llevar a cabo un diagnóstico prenatal que permite la detección de las posibles anomalías cromosómicas y enfermedades genéticas.

- 15 En una realización preferida, en el método de acuerdo con la presente invención, dichas anomalías cromosómicas son anomalías numéricas o anomalías estructurales de cromosomas, y dichas enfermedades genéticas se seleccionan del grupo que consiste en fibrosis quística, anemia drepanocítica, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, amiotrofia espinal y neurofibromatosis.

Como resultado de las mutaciones, el cariotipo podría cambiar con respecto al número o forma de los cromosomas que lo constituyen, lo que da origen, respectivamente, a anomalías numéricas de cromosomas (aneuploidía) y a anomalías estructurales de los cromosomas.

- 20 Las aneuploidías numéricas más frecuentes que se observan en los humanos son la monosomía (ausencia de un elemento de la pareja de cromosomas homólogos) y la trisomía (presencia de un elemento adicional de la pareja de cromosomas homólogos). Estos ejemplos se definen como monosomía y trisomía completa, aunque también se puede producir la monosomía/trisomía parcial debido a la ausencia o la presencia en copia triple de determinados segmentos del cromosoma.

- 25 Las monosomías completas son incompatibles con la vida posnatal, excepto la monosomía del cromosoma X asociada al síndrome de Turner (45, X).

Por el contrario, las trisomías completas de algunos cromosomas, tales como la trisomía 21 o síndrome de Down (47, XX, +21), la trisomía 18 o síndrome de Edwards (47, XX, +18), la trisomía 13 o síndrome de Patau (47, XX, +13) son compatibles con la vida posnatal, así como las aneuploidías de los cromosomas sexuales.

Las enfermedades genéticas pueden ser mono- o multifactoriales.

- 30 Las enfermedades genéticas monofactoriales están ocasionadas por la mutación de un único gen y se denominan también mendelianas. Hasta ahora, los investigadores han clasificado aproximadamente 7000 de estas enfermedades. Las que se conocen mejor son la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchenne, la amiotrofia espinal y la neurofibromatosis.

- 35 Las enfermedades genéticas multifactoriales son el resultado de la combinación de varios factores genéticos y medioambientales en concurrencia. Por lo general, las enfermedades multifactoriales incluyen típicamente las enfermedades más habituales de la edad adulta, tales como asma, osteoporosis, obesidad, hipertensión, arteriopatía coronaria, junto con diferentes anomalías cardíacas. Tanto en el periodo neonatal como en la edad adulta, el impacto clínico de estas enfermedades representa una carga importante.

- 40 También se describe, pero no se reivindica, un kit de diagnóstico para el aislamiento de eritroblastos fetales intactos de la sangre periférica materna de acuerdo con el método de la presente invención, que comprende:

- una solución para la preparación de gradientes de densidad,
- una solución salina para la dilución de la muestra de sangre periférica,
- heparina y, facultativamente, soluciones de lavado.

Ejemplos

- 45 Ejemplo 1: Pacientes

En el departamento de obstetricia de la Clínica Mangiagalli se incorporaron las mujeres embarazadas después de que proporcionasen el consentimiento informado. Se recogieron de seis a 14 ml de sangre venosa a partir de 130 mujeres embarazadas (tabla 1).

Tabla 1

Semanas de gestación	N.º de pacientes
5	1
6	3
8	1
9	5
10	5
11	15
12	25
13	10
14	7
15	15
16	17
17	5
18	5
20	2
21	3
23	1
24	2
25	1
28	4
30	1
35	1

Tabla 1. Lista de pacientes analizadas, dividida por su número de acuerdo con la etapa gestacional.

5 Etapa gestacional cuando es posible identificar los eritrocitos nucleados: se analizaron muestras de 5 a 35 semanas de gestación. Existe una variabilidad dentro de cada sujeto, aunque, tal y como se describe en la bibliografía, la cantidad más grande de eritrocitos nucleados se encontró en las primeras semanas de gestación. El periodo óptimo de recogida es aproximadamente de las 8 a 12 semanas de gestación.

Ejemplo 2: Tratamiento previo de la muestra por aislamiento de las células nucleadas

10 La etapa de aislamiento de los eritrocitos nucleados está precedida por una etapa de tratamiento previo de la muestra de sangre periférica materna antes de la separación.

La etapa de tratamiento previo se puede llevar a cabo ventajosamente, por ejemplo, por medio de una solución para la preparación de gradientes de densidad, tal como Ficoll™, preferiblemente a través de Lympholite®-H (Euroclone, Milán).

Se pueden anticipar otros tipos de tratamiento previo de las muestras, como por ejemplo la lisis o la dilución de los eritroblastos.

Ejemplo 3: Carga de la muestra en el canal

La muestra pretratada y separada como está descrito en el ejemplo 2 se carga en el canal del instrumento para la separación de las células mediante GrFFF.

Antes cargar la muestra, se lava el canal con una solución de hipoclorito de sodio al 20% y a continuación se lava exhaustivamente con agua destilada estéril, y, finalmente, se lava con solución salina estéril que contiene heparina. Cuando el flujo por el canal es estable (esto es, la absorbancia es estable), la muestra pretratada se inyecta en el canal. Se cargan en el canal aproximadamente 5×10^5 células en el volumen final de 50 µl.

Los parámetros relevantes para una buena separación de la muestra en el canal son:

- factor de dilución de la muestra;

- número de células cargadas en el canal;

- variabilidad del periodo de relajación de las células dentro del canal;

- velocidad de flujo por el canal; y

- características del medio de dilución y de los factores anticoagulantes presentes.

En cuanto al factor de dilución de la muestra, puede variar en un margen de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^6 células en 50 µl, preferiblemente aproximadamente 5×10^5 células en 50 µl.

En cuando al número de células a cargar en el canal, se ha observado una mala separación de la muestra en el caso de cargar muy pocas células (la muestra está extremadamente diluida) o demasiadas células (la muestra está extremadamente concentrada).

El periodo de relajación dura aproximadamente dos minutos y no se halla ninguna mejora significativa con periodos de más de 4 o 6 minutos, mientras que un periodo más corto da lugar a una peor separación.

En cuanto al medio de elución, los mejores resultados se obtuvieron con solución salina complementada con heparina 1:1000, con el uso de heparina EPSOCLAR a 25.000 UI/5 ml, solución para infusión.

La velocidad de flujo por el canal puede variar en un margen de aproximadamente 50 µl por minuto hasta 1 ml por minuto, preferiblemente tal velocidad puede estar en un margen de aproximadamente 100 µl/min a aproximadamente 400 µl/min, incluso más preferiblemente la velocidad es de 250 µl/min.

Ejemplo 4: Análisis de la muestra por absorbancia

La muestra separada en el canal tal y como está descrito en el ejemplo 3 se lee en un espectrofotómetro a 600 nm, lo que produce un gráfico como el que se ilustra a modo de ejemplo para las muestras de la figura 1 y de la figura 2.

En el gráfico se pueden distinguir tres zonas que muestran un cambio de absorbancia con respecto al valor cero obtenido en los ciclos de la solución salina con heparina (zona 0):

la zona 1 (*void*) corresponde a la evacuación de residuos celulares y linfocitos desde el canal;

la zona 2 corresponde principalmente a la evacuación de células nucleadas fetales;

la zona 3 corresponde principalmente a la evacuación de los granulocitos.

Ejemplo 5: Caracterización de las fracciones de las células recogidas

Las células de cada fracción se contaron con una cámara de Burkner y se extendieron en un portaobjetos mediante un «frotis» o Cytospin™.

Posteriormente, las células se tiñeron con la tinción de Giemsa (figura 3) y con o-dianisidina (figura 4), y se analizaron al microscopio para verificar la presencia de eritrocitos nucleados.

Se pudo detectar la presencia de eritroblastos (eritrocitos nucleados) en la fracción eluida que se recogió.

Ejemplo 6: análisis por FACS

El análisis por FACS se realizó con 12 pacientes.

El sistema de fraccionamiento por campo gravitatorio y flujo (GrFFF) ha resultado ser capaz de separar los diferentes tipos de poblaciones presentes en la sangre materna.

Los eritroblastos fetales (eritrocitos nucleados) se encuentran en la zona 2 (figura 5).

- 5 El rendimiento porcentual de eritrocitos nucleados ha alcanzado incluso el 61,7% de las células vivas y se concibe un mayor enriquecimiento mediante la selección negativa de linfocitos CD45+, ya que los eritrocitos nucleados son CD45-. En este caso, el rendimiento estaría en torno al 100%.

Ejemplo 7: Análisis por PCR en tiempo real y por PCR con fluorescencia cuantitativa

- 10 Para encontrar si era posible identificar el sexo del feto a partir de las células fetales aisladas tal y como está descrito en el ejemplo 3, se llevó a cabo un análisis por PCR en tiempo real con 11 muestras mediante el uso de una sonda específica de del cromosoma Y que detecta la presencia del gen *SRY*; el uso de una sonda para *SRY* (Y. M. Dennis Lo, Mark S. C. Tein, Tze K. Lau, Christopher J. Haines, Tse N. Leung, Priscilla M. K. Poon, James S. Wainscoat, Philip J. Johnson, Allan M. Z. Chang y N. Magnus Hjelm, «Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis», *Am. J. Hum. Genet.* 62: 768-775, 1998) fue posible determinar la presencia del gen *SRY* y, por lo tanto, la presencia del cromosoma Y en las muestras de varones. En particular, el experimento descrito más arriba se muestra en la figura 6, en donde las muestras de varones permiten observar un incremento de la fluorescencia que no se detecta en las muestras de control de las mujeres.

- 20 De igual forma, el análisis por PCR con fluorescencia cuantitativa en una muestra mostró la presencia de dos genomas diferentes, a saber, ADN materno y ADN fetal.

En particular, en la figura 7 se muestra la presencia de diferentes picos con respecto tanto a la altura como al número (tres o incluso cuatro picos), con lo que se proporciona la indicación de que están presentes dos genomas diferentes.

Ejemplo 8: Secuenciación del ADN de las células fetales de una mujer embarazada portadora de hemofilia

- 25 El análisis por secuenciación de la región del gen de la enfermedad fue posible en un solo paciente hemofílico. Se encontró que la madre era heterocigota y que el feto era homocigoto.

Ejemplo 9: Ejemplo de protocolo operacional

- Retirar Lympholite® del frigorífico al menos 20 minutos antes para equilibrarlo a la temperatura ambiente (para obtener la densidad adecuada para la separación de las células).
- 30 - Retirar la PBS del frigorífico al menos 20 minutos antes para equilibrarla a la temperatura ambiente (para que las células no sufran un choque térmico).
- Encender la bomba peristáltica para estabilizar el flujo por el canal. Velocidad de 0,35 ml/min.
1. El tubo problema que contiene la muestra de sangre y EDTA (14 ml) se diluye con el mismo volumen de PBS (que no esté fría).
- 35 2. Distribuir en alícuotas un volumen de Lympholite® igual al volumen de sangre en tubos Falcon™ (a temperatura ambiente).
3. Verter muy suavemente la sangre diluida en PBS por la pared del tubo de ensayo sin romper la interfase de Lympholite®.
4. Centrifugar a 800g durante 26 minutos con el freno a 0.
- 40 5. Recuperar el anillo de linfocitos con una pipeta Pasteur de vidrio
6. Añadir la solución salina + heparina (1:1000) y centrifugar a 800g durante 10 minutos.
7. Añadir la solución salina + heparina (1:1000) al sedimento.
8. Resuspender el sedimento en 400 µl de solución salina + heparina (1:1000).
9. Contar las células:
- 45 • preparar la cámara Burkert, y adaptarle el cubreobjetos para que cubra ambas cámaras de recuento;
- preparar una solución a 1:20 por la adición de 1 µl de la suspensión de células a 19 µl de solución salina +

heparina (o más exactamente, 2 µl de la suspensión de células a 38 µl de la solución salina + heparina) en un tubo nuevo;

- preparar un segundo tubo de ensayo y añadir 1 µl de azul tripano a 9 µl de la dilución 1:20 anterior;

5 • cargar en una cámara de Burker por capilaridad 10 µl de la muestra del segundo tubo de ensayo (que consiste en 1 µl de azul tripano y 9 µl de la dilución 1:20 anterior);

- esperar unos pocos segundos hasta que las células se detengan en los campos y contar los 4 cuadrados grandes: contar solo las células vivas (aquellas en las que no ha penetrado el colorante);

- calcular la media (M), multiplicar por el factor de dilución (20) y 10^4 (el factor de la cámara de Burker): $M \times 20 \times 10^4 = n.^{\circ}$ de células por mililitro;

10 • multiplicar el volumen de células por mililitro por el volumen de la suspensión (0,4 ml): células por mililitro $\times$ 0,4 = células totales presentes en la suspensión.

10. Cargar $5-6 \times 10^5$ células como 50 µl de suspensión celular, y calcular el necesario factor de dilución de la suspensión.

11. Detener el flujo. Inyectar la muestra con una jeringuilla.

15 12. Restablecer el flujo a 0,25 ml/min durante 15 segundos.

13. Detener y dejar que la muestra se relaje durante 2 minutos.

14. Girar la válvula.

15. Restablecer el flujo a 0,35 ml/min.

16. Recoger la primera parte del pico (desde la ausencia hasta la meseta) en un tubo Falcon™.

20 17. Antes de la segunda inyección, permitir que la muestra se evacúe completamente desde el canal.

18. Una vez que se han recogido varias fracciones de la primera parte del pico, centrifugar a 800g durante 6 minutos.

19. Secar los sedimentos para la posterior extracción del ADN o resuspender el sedimento para el recuento y la extensión en el portaobjetos.

25 Las ventajas conseguidas mediante el método de la presente invención son evidentes a partir de la descripción detallada y de los ejemplos anteriores. En particular, este método ha constatado, de forma sorprendente y ventajosa, su idoneidad para el diagnóstico no invasivo de las anomalías cromosómicas y de las enfermedades genéticas del feto. Al mismo tiempo, este método, al ser rápido y muy fácil de llevar a la práctica, se puede aplicar con comodidad en cualquier tipo de laboratorio de investigación o de análisis diagnóstico.

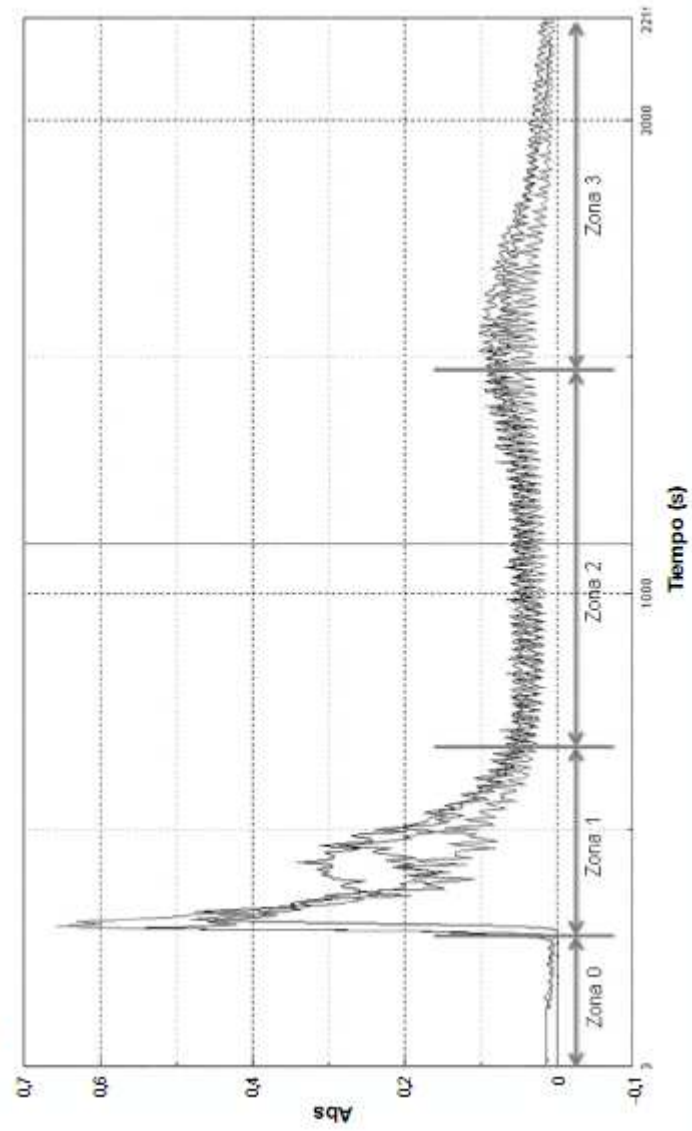
LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> FONDAZIONE IRCCS CAà\200\231 GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO	
	<120> Método no invasivo para el diagnóstico prenatal	
5	<130> 11215PTWO	
	<150> ITMI2013A000683	
	<151> 24-04-2013	
	<160> 2	
	<170> BISSAP 1.2	
10	<210> 1	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
15	<221> fuente	
	<222> 1..33	
	<223> /organism="Homo sapiens"	
	/note="Hemophilia heterozygosity"	
	/mol_type="unassigned ADN"	
	<400> 1	
	ctaccttcga attcaccccc agagttgggt gca	33
20	<210> 2	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
25	<221> source	
	<222> 1..30	
	<223> /organism="Homo sapiens"	
	/note="Hemophilia homozygosity"	
	/mol_type="unassigned ADN"	
30	<400> 2	
	taccttcgaa ttcacccccca gagttgggtg	30

REIVINDICACIONES

1. Método para el aislamiento de eritroblastos fetales intactos a partir de una muestra de sangre periférica de una mujer embarazada, que comprende las etapas de:
 - a. aplicar un flujo laminar mediante el fraccionamiento por campo gravitatorio y flujo (GrFFF) a la muestra de sangre que contiene los eritroblastos fetales intactos, y
 - b. aislar los eritroblastos fetales intactos de los otros componentes de la sangre.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa adicional de:
 - c. extraer el ADN, el ARN y las proteínas de los eritroblastos fetales intactos aislados en la etapa b.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde, antes de aplicar el flujo laminar, se trata la muestra de sangre con una solución para la preparación de gradientes de densidad.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de sangre periférica procede de una mujer embarazada desde la octava a la vigesimosegunda semana de gestación.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el flujo laminar se aplica a una velocidad que oscila de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 1 ml/min , preferiblemente a una velocidad de flujo que oscila de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 400 $\mu\text{l}/\text{min}$.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el flujo laminar se aplica a una muestra que oscila de 1×10^5 células a 1×10^6 células en 50 μl , preferiblemente a 5×10^5 células en 50 μl .
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos eritroblastos fetales aislados se aíslan a un tiempo de elución que oscila de 5 minutos a 40 minutos.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos eritroblastos fetales aislados se utilizan para realizar un diagnóstico prenatal que permite la identificación de cualquier anomalía cromosómica y enfermedad genética.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dichas anomalías cromosómicas son anomalías numéricas o estructurales de los cromosomas, y dichos trastornos genéticos se seleccionan del grupo que consiste en fibrosis quística, anemia drepanocítica, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, amiotrofia espinal y neurofibromatosis.

Figura 1



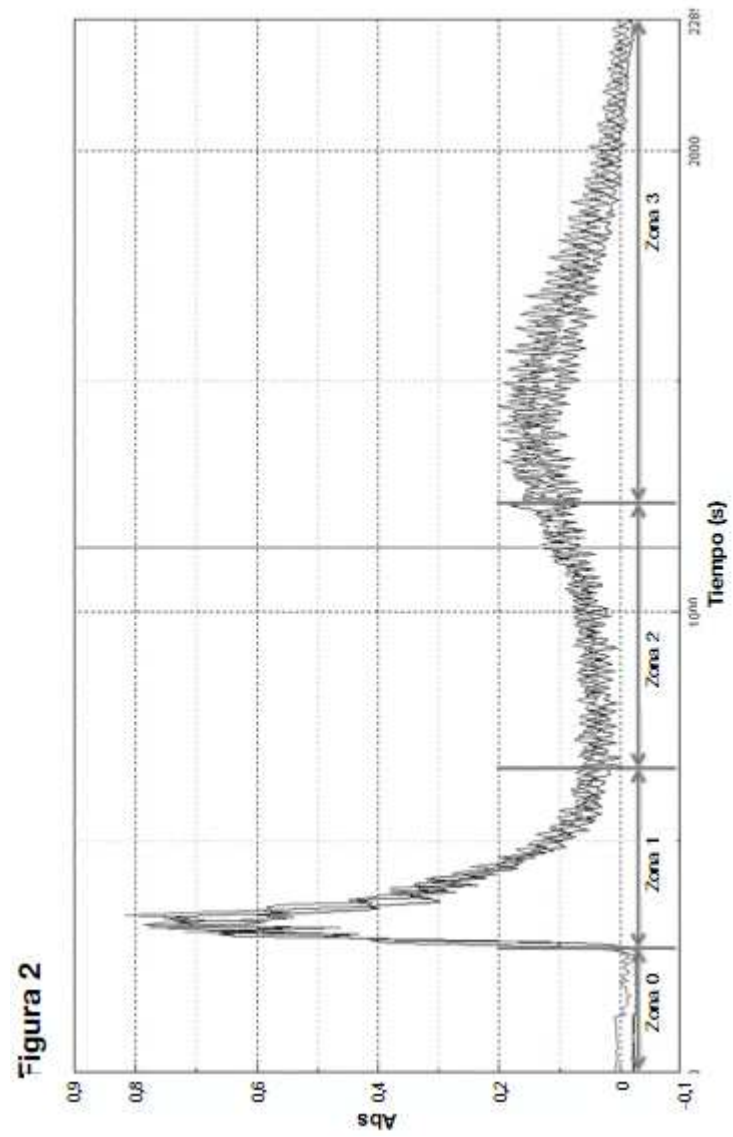
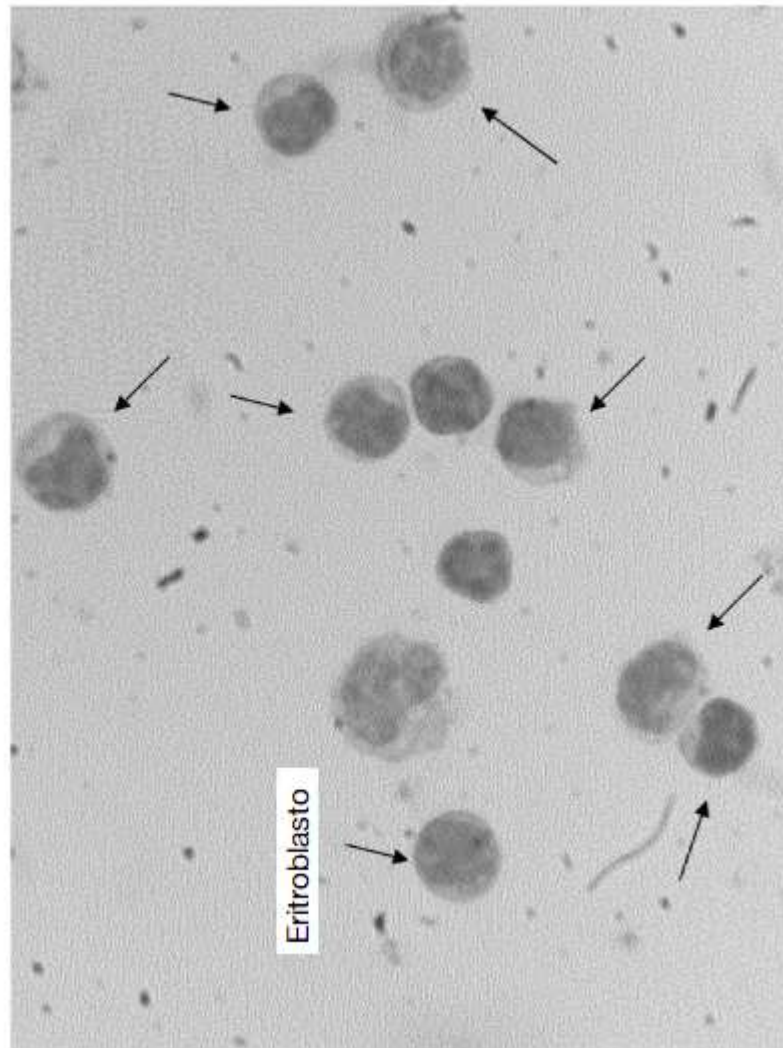


Figura 3



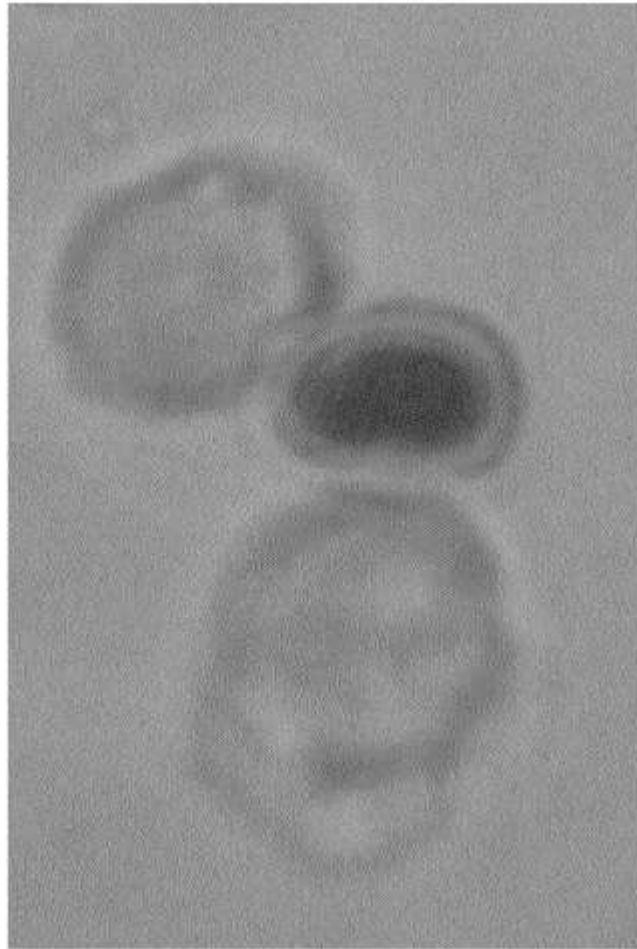


Figura 4

Figura 5A

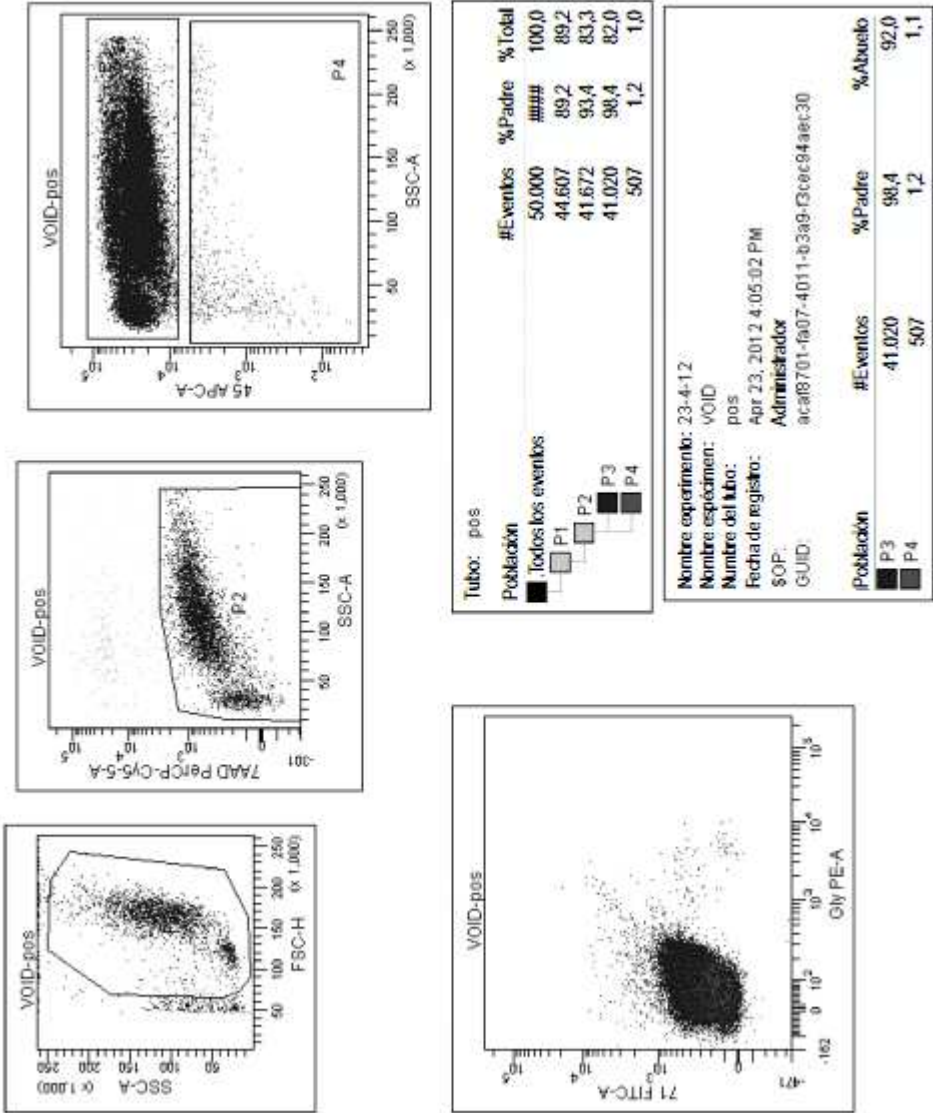


Figura 5B

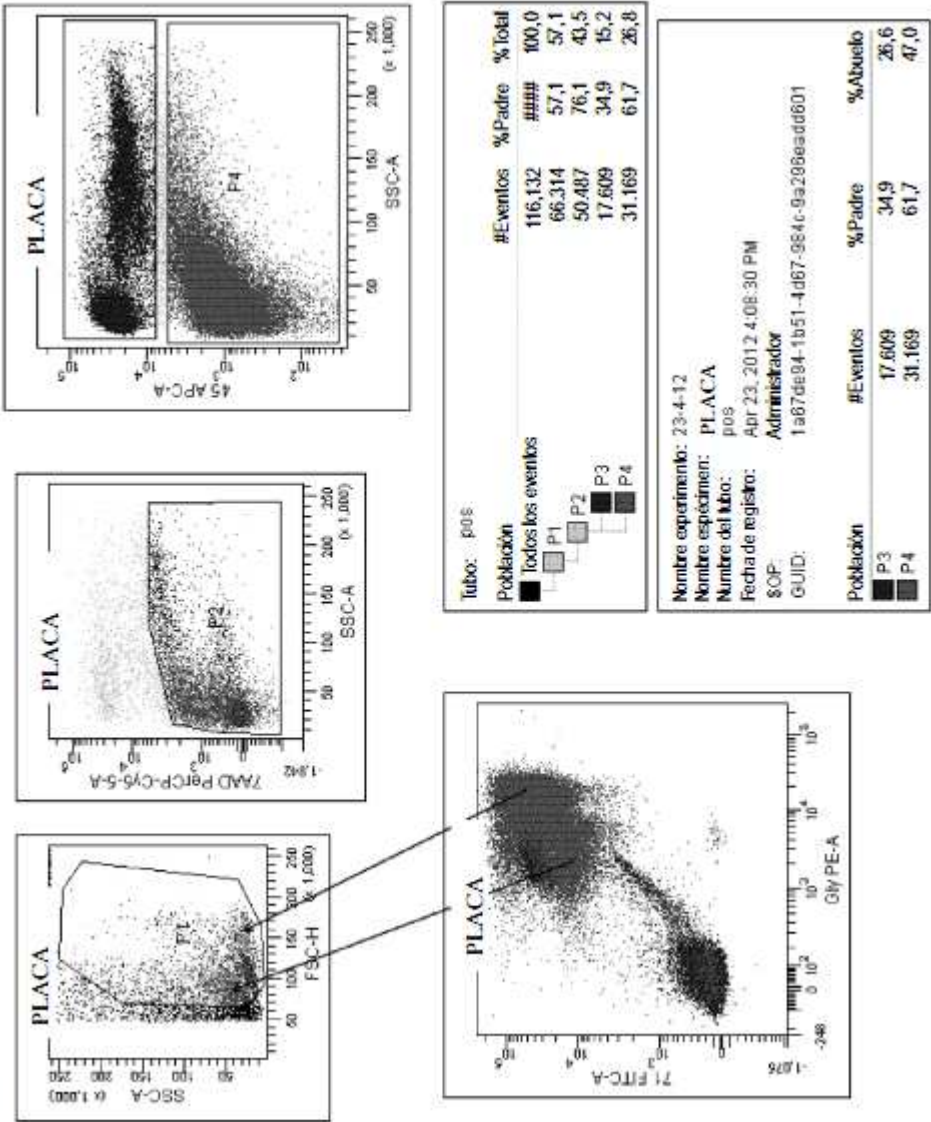


Figura 5C

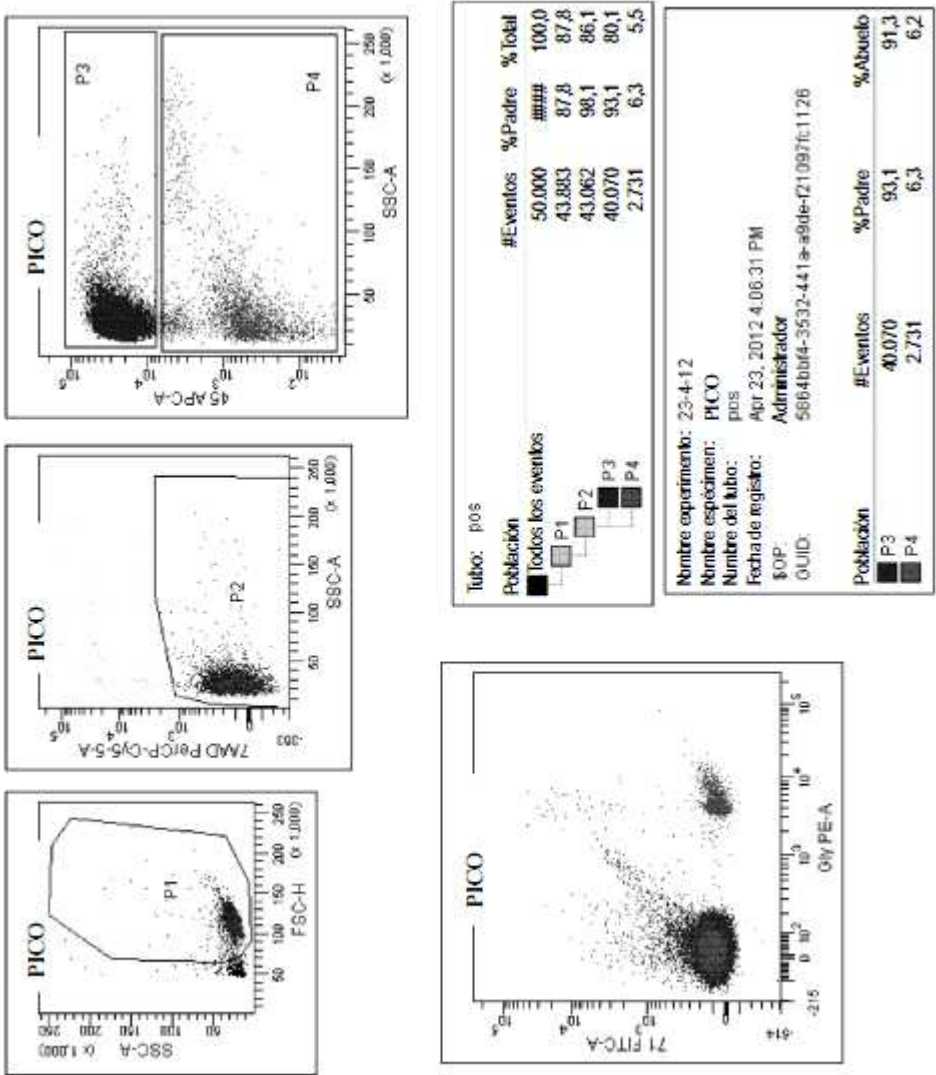


Figura 5D

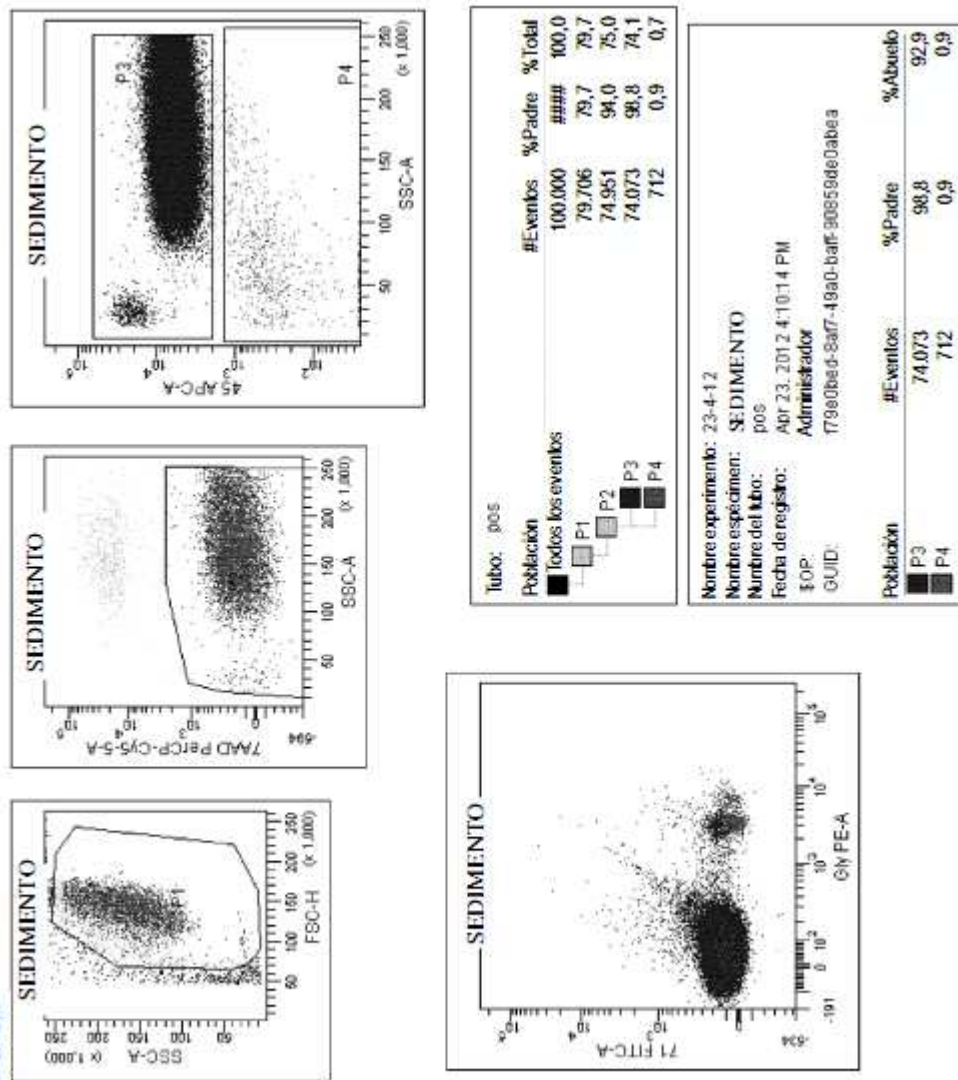


Figura 6

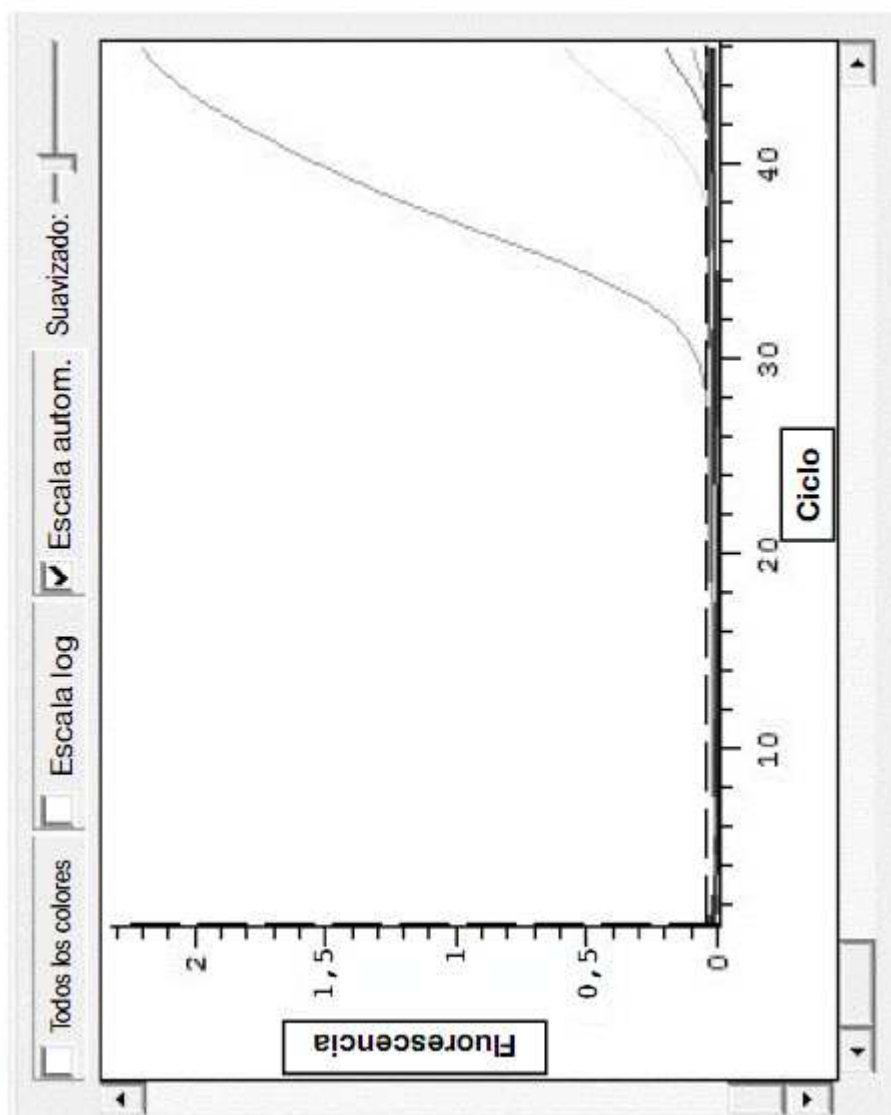


Figura 7A

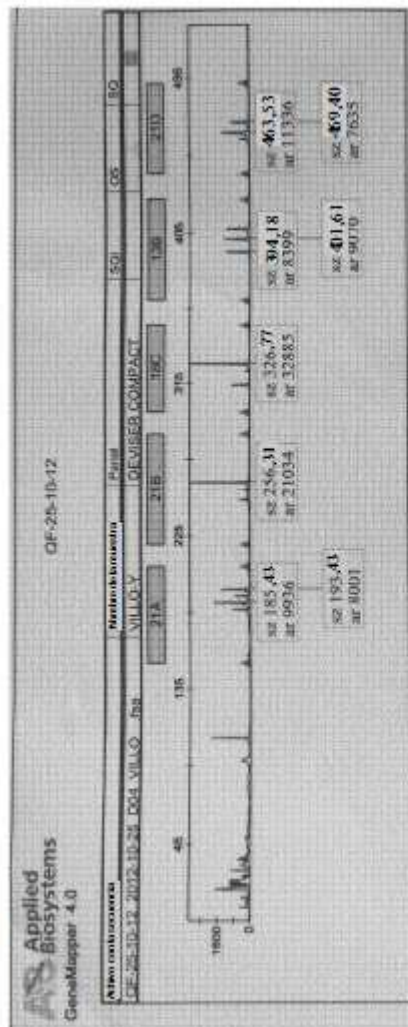


Figura 7B

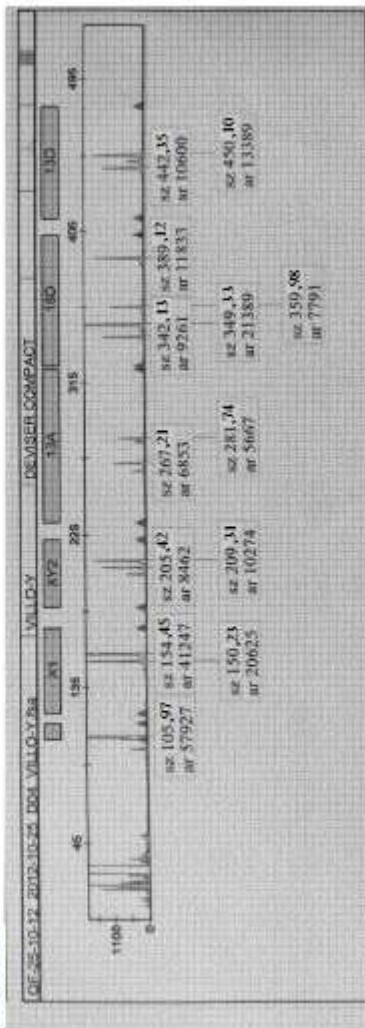


Figura 8

