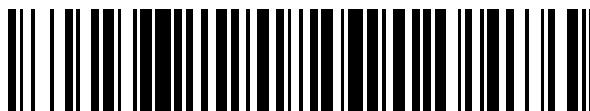


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 131**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2012 PCT/US2012/021955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12102945**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2012 E 12738737 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2668605**

54 Título: **Cálculo del riesgo para la evaluación de la aneuploidia fetal**

30 Prioridad:

25.01.2011 US 201161436135 P

09.12.2011 US 201113316154

28.12.2011 US 201113338963

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

22.10.2019

73 Titular/es:

ARIOSA DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)

5945 Optical Court

San Jose, CA 95138, US

72 Inventor/es:

OLIPHANT, ARNOLD;

SPARKS, ANDREW;

WANG, ERIC y

STRUBLE, CRAIG

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 728 131 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

Cálculo del riesgo para la evaluación de la aneuploidia fetal

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento no invasivo para calcular el riesgo de variaciones en el número de copias genómicas fetales, tales como aneuploidias, usando muestras maternas, incluyendo sangre, plasma y suero maternos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el siguiente análisis, determinados artículos y procesos se describirán para fines de introducción y antecedentes. Nada de lo contenido en el presente documento se debe interpretar como una "admisión" de la técnica anterior. El solicitante se reserva expresamente el derecho de demostrar, cuando corresponda, que los artículos y procesos a los que se hace referencia en el presente documento no constituyen una técnica anterior según las disposiciones legales aplicables.

15

El Congreso Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) recomienda que se ofrezca a las mujeres embarazadas pruebas de detección no invasivas para detectar anomalías cromosómicas fetales. Dado que los procedimientos de detección existentes presentan tasas de falsos positivos y negativos en el intervalo de un 5 % y un 10 %, respectivamente, el ACOG también recomienda que a las pacientes clasificados mediante pruebas de detección como con alto riesgo de aneuploidia fetal se les ofrezcan pruebas invasivas tales como amniocentesis o muestreo de vellosidades coriónicas. Aunque estos procedimientos invasivos son muy exactos, son caros y conllevan un riesgo de pérdida del feto normal de aproximadamente un 0,5 %. Para abordar estas limitaciones, se han desarrollado procedimientos no invasivos de detección de aneuploidia fetal.

20

25

En particular, los intentos más recientes de identificar aneuploidias han usado sangre materna como material de partida. Dichos esfuerzos han incluido el uso de ADN extracelular (ADNe) para detectar la aneuploidia fetal en una muestra de una mujer embarazada, incluyendo el uso de secuenciación aleatoria paralela masiva (MPSS) para cuantificar con precisión el aumento de fragmentos de ADNe de cromosomas trisómicos. La dosis cromosómica resultante de la aneuploidia fetal, sin embargo, está directamente relacionada con la fracción de ADNe fetal. La variación de la contribución del ácido nucleico fetal entre muestras puede, por tanto, complicar el análisis, ya que el nivel de contribución fetal a una muestra materna variará las cantidades que se necesitan detectar para calcular el riesgo de que un cromosoma fetal sea aneuploide.

30

35

Por ejemplo, una muestra de ADNe que contiene un 4 % de ADN de un feto con trisomía 21 debería presentar un aumento de un 2 % en la proporción de lecturas del cromosoma 21 (chr21) en comparación con un feto normal. Distinguir una trisomía 21 de un feto normal con alta confianza usando una muestra materna con un porcentaje de ácido nucleico fetal de un 4 % requiere un gran número (>93 K) de observaciones del cromosoma 21, lo cual es todo un desafío y no es rentable usando técnicas no selectivas tales como MPSS.

40

Por tanto, serían de gran beneficio en la técnica procesos mejorados para el cálculo del riesgo de variaciones en el número de copias genómicas fetales, por ejemplo, anomalías en la dosis cromosómica tales como aneuploidias.

45

SUMARIO DE LA INVENCION

Este sumario se proporciona para presentar una selección de conceptos en una forma simplificada que se describen además a continuación en la descripción detallada. Este sumario no pretende identificar rasgos característicos clave o esenciales de la materia objeto reivindicada, ni se pretende su uso para limitar el alcance de la materia objeto reivindicada. Otros rasgos característicos, detalles, utilidades y ventajas de la materia objeto reivindicada serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada escrita, incluyendo aquellos aspectos ilustrados en los dibujos adjuntos y definidos en las reivindicaciones adjuntas.

50

55

Por tanto, en un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento no invasivo para calcular el riesgo de aneuploidia fetal en una muestra materna como se establece en la reivindicación 1.

En algunos aspectos de este modo de realización, la muestra materna es una muestra materna extracelular, y en algunos casos, la muestra materna extracelular es plasma o suero maternos. En otros aspectos, la muestra materna comprende células.

60

En algunos aspectos de este modo de realización, los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia comprenden información relacionada con la edad materna, y en algunos aspectos, los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia comprenden información relacionada con la edad gestacional. Aún en otros modos de realización,

65

los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia comprenden información relacionada tanto con la edad materna como con la edad gestacional.

5 En algunos aspectos de este modo de realización, la dosis cromosómica del primer y segundo cromosoma fetal se estima interrogando al menos diez loci en cada cromosoma para el cual se está estimando la dosis cromosómica, y en algunos modo de realización, la dosis cromosómica del primer y segundo cromosoma se estima interrogando al menos cuarenta y ocho loci o al menos noventa y seis loci en cada cromosoma para el cual se estima la dosis cromosómica.

10 Los loci interrogados para la estimación de la dosis cromosómica del primer y segundo cromosoma fetal son loci no polimórficos.

La determinación de la proporción de ácido nucleico fetal en la muestra materna se realiza interrogando uno o más loci polimórficos en la muestra materna.

15 Del riesgo de aneuploidia fetal se informa como un cociente de posibilidades, y en otros aspectos de la invención, el riesgo de aneuploidia fetal para el primer cromosoma fetal se basa en un valor de una probabilidad de que el primer cromosoma fetal sea trisómico y un valor de una probabilidad de que el primer cromosoma fetal sea disómico. En otros aspectos, el riesgo de aneuploidia fetal para el primer cromosoma fetal se basa en un valor de una probabilidad de que el primer cromosoma fetal sea monosómico y un valor de una probabilidad de que el primer cromosoma fetal sea disómico.

20 Se pueden usar numerosas formas de determinar la proporción de ácido nucleico fetal, como se describe con más detalle en el presente documento. En determinados aspectos, la proporción de ácido nucleico fetal se determina para un único cromosoma fetal. En otros aspectos, la proporción de ácido nucleico fetal se determina para dos o más cromosomas fetales. En otros aspectos, la proporción de ácido nucleico fetal refleja la proporción total de ácidos nucleicos fetales en la muestra materna.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 La figura 1 es un diagrama de bloques que ilustra un entorno de sistema ejemplar.

La figura 2 es una tabla con datos demográficos de los sujetos de los cuales se obtuvieron y analizaron muestras maternas en los ejemplos.

35 Las figuras 3A y 3B son gráficos que ilustran los estadísticos Z de la cohorte frente a la proporción fetal. El estadística Z de la proporción de cromosomas se representa gráficamente para el cromosoma 18 (A) o el cromosoma 21 (B) frente a la fracción de ADN fetal para cada sujeto de la cohorte. Los sujetos disómicos se representan como rombos negros, los sujetos trisómicos como rombos grises.

40 Las figuras 4A y 4B son gráficos que ilustran las probabilidades del cálculo del riesgo de la cohorte frente a la proporción fetal. Las probabilidades calculadas de riesgo de trisomía frente a disomía para el cromosoma 18 (A) o el cromosoma 21 (B) se representan gráficamente frente a la fracción de ADN fetal para cada sujeto de la cohorte. Los sujetos disómicos se representan como rombos negros, los sujetos trisómicos como rombos grises.

45 Las figuras 5A y 5B son gráficos que ilustran las probabilidades de cálculo del riesgo de la cohorte con enmascaramiento (segunda) de la presente invención frente a la proporción fetal. Las probabilidades calculadas de riesgo de trisomía frente a disomía para el cromosoma 18 (A) o el cromosoma 21 (B) se representan gráficamente frente a la fracción de ADN fetal para cada sujeto de la cohorte con enmascaramiento (segunda). Los sujetos disómicos se representan como rombos negros, los sujetos trisómicos como rombos grises.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 Los procesos descritos en el presente documento pueden emplear, a menos que se indique de otro modo, técnicas y descripciones convencionales de la biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), la genómica, la bioquímica y la tecnología de secuenciación, que están dentro de las habilidades de los expertos en la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen hibridación y ligado de oligonucleótidos, secuenciación de próxima generación y detección de hibridación usando un marcador. Se pueden tener ilustraciones específicas de técnicas adecuadas por referencia a los ejemplos en el presente documento. Sin embargo, también se pueden usar procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio estándar Green, *et al.*, Eds., *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV)* (1999); Weiner, *et al.*, Eds., *Genetic Variation: A Laboratory Manual* (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (2003); Bowtell y Sambrook, *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual* (2003); Mount, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2004); Sambrook y Russell, *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2006); y Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2002) (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L.,

Biochemistry (4.^a Ed.) W.H. Freeman, New York (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, London (1984); Nelson y Cox, Lehninger, Principles of Biochemistry, 3.^a Ed., W. H. Freeman Pub., New York (2000); y Berg *et al.*, Biochemistry, 5.^a Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002), Antes de que se describan las presentes composiciones, herramientas de investigación y procesos, se debe entender que la presente invención no se limita a los procesos, composiciones, objetivos y usos específicos descritos, ya que, por supuestos, estos pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir solo aspectos particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

Cabe destacar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", y el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente algo diferente. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una región de ácido nucleico" se refiere a una, más de una, o mezclas de dichas regiones, y la referencia a "un ensayo" incluye referencia a etapas y procesos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se debe entender que cada valor intermedio entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado se engloba dentro de la invención. Cuando el intervalo indicado incluye límites superiores e inferiores, los intervalos que excluyen cualquiera de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se indique expresamente, los términos usados en el presente documento pretenden tener el significado simple y ordinario entendido por los expertos en la técnica. Las siguientes definiciones pretenden ayudar al lector a comprender la presente invención, pero no pretenden variar o limitar de otro modo el significado de dichos términos a menos que se indique específicamente.

En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la materia que la presente invención se puede poner en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, los rasgos característicos bien conocidos y los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica no se han descrito para evitar ocultar la invención.

Definiciones

Los términos usados en el presente documento pretenden tener el significado simple y ordinario entendido por los expertos en la técnica. Las siguientes definiciones pretenden ayudar al lector a comprender la presente invención, pero no pretenden variar o limitar de otro modo el significado de dichos términos a menos que se indique específicamente.

El término "ácido nucleico amplificado" es cualquier molécula de ácido nucleico cuya cantidad se haya incrementado al menos dos veces mediante cualquier proceso de amplificación o replicación de ácido nucleico realizado *in vitro* en comparación con la cantidad inicial en una muestra materna.

El término "anomalía de la dosis cromosómica" se refiere a duplicaciones o deleciones de todo (aneuploidia) o parte de un cromosoma.

El término "herramienta de diagnóstico" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier composición o ensayo de la invención usado en combinación como, por ejemplo, en un sistema para llevar a cabo una prueba de diagnóstico o ensayo en una muestra de paciente.

El término "región distintiva" se refiere a una región que es mensurablemente diferente entre los loci. Dichas diferencias incluyen, pero no se limitan a, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), diferencias en el estado de metilación, mutaciones que incluyen mutaciones puntuales e indels, repeticiones cortas en tándem, variantes del número de copias y similares.

El término "hibridación" significa, en general, la reacción por la cual se produce el emparejamiento de cadenas complementarias de ácido nucleico. El ADN es habitualmente monocatenario, y cuando las hebras se separan, volverán a hibridar en las condiciones apropiadas. Se pueden formar híbridos entre ADN-ADN, ADN-ARN o ARN-ARN. Se pueden formar entre una hebra corta y una hebra larga que contiene una región complementaria a la corta. También se pueden formar híbridos imperfectos, pero cuanto más imperfectos son, menos estables serán (y menos probable que se formen).

El término "factor extrínseco" incluye cualquier información pertinente para el cálculo de un cociente de posibilidades que no se derive empíricamente a través de detección de un locus materno y fetal. Los ejemplos de dichos factores extrínsecos incluyen información relacionada con la edad materna, información relacionada con la edad gestacional, información relacionada con embarazos previos con un feto aneuploide, resultados previos de pruebas de detección en suero y similares. En modos de realización preferentes, la etapa de ajustar el

cociente de posibilidades calculado usa factores extrínsecos relacionados tanto con la edad materna como con la edad gestacional.

5 Los términos "locus" y "loci" como se usan en el presente documento se refieren a una región de ácido nucleico de localización conocida en un genoma.

El término "locus informativo", como se usa en el presente documento, se refiere a un locus con una o más regiones distintivas que es homocigota en una fuente y heterocigota en otra fuente dentro de una muestra mixta.

10 El término "muestra materna", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra tomada de un mamífero gestante que comprende una fuente materna y una fuente fetal de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN o ADN).

15 Como se usa en el presente documento, "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a una técnica para replicar una pieza específica de ADN diana *in vitro*, incluso en presencia de un exceso de ADN inespecífico. Se añaden cebadores al ADN diana, donde los cebadores inician la copia del ADN diana usando nucleótidos y, típicamente, polimerasa Taq o similares. Ciclando la temperatura, el ADN diana se desnaturaliza y se copia repetidamente. Una sola copia del ADN diana, incluso si se mezcla con otro ADN aleatorio, se puede amplificar para obtener miles de millones de réplicas. La reacción en cadena de la polimerasa se puede usar para detectar y medir cantidades muy pequeñas de ADN y para crear piezas personalizadas de ADN. En algunos casos, pueden usar procesos de amplificación lineal como una alternativa a la PCR.

20 El término "polimorfismo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier característica genética en un locus que puede ser indicativa de ese locus en particular, incluyendo, pero no limitada a, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), diferencias de metilación, repeticiones cortas en tándem (STR) y similares.

25 En general, un "cebador" es un oligonucleótido usado para, por ejemplo, cebar la extensión, ligado y/o síntesis de ADN, tal como en la etapa de síntesis de la reacción en cadena de la polimerasa o en las técnicas de extensión de cebadores usadas en determinadas reacciones de secuenciación. También se puede usar un cebador en técnicas de hibridación como un medio para proporcionar complementariedad de una región de ácido nucleico con un oligonucleótido de captura para la detección de una región de ácido nucleico específica.

30 El término "herramienta de investigación", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición o ensayo de la invención usado para investigación científica, de naturaleza académica o comercial, incluyendo el desarrollo de productos terapéuticos farmacéuticos y/o biológicos. Las herramientas de investigación de la invención no pretenden ser terapéuticas o estar sujetas a aprobación por las autoridades reguladoras; más bien, las herramientas de investigación de la invención pretenden facilitar la investigación y ayudar en dichas actividades de desarrollo, incluyendo las actividades realizadas con la intención de producir información para respaldar la presentación de un expediente de registro.

35 El término "región de ácido nucleico seleccionada", como se usa en el presente documento, se refiere a una región de ácido nucleico correspondiente a una región genómica en un cromosoma individual. Dichas regiones de ácido nucleico seleccionadas se pueden aislar directamente y enriquecer de la muestra para detección, por ejemplo, en base a hibridación y/u otras técnicas basadas en secuencias, o se pueden amplificar usando la muestra como molde antes de la detección de la secuencia. Las regiones de ácidos nucleicos para su uso en los sistemas de procesamiento de la presente invención se pueden seleccionar en base de la variación del nivel de ADN entre individuos, en base de la especificidad por un cromosoma particular, en base del contenido de CG y/o las condiciones de amplificación requeridas de las regiones de ácido nucleico seleccionadas, u otras características que serán evidentes para un experto en la técnica tras leer la presente divulgación.

40 Los términos "secuenciación", "determinación de secuencia" y similares, como se usan en el presente documento, se refieren, en general, a todos y cada uno de los procesos bioquímicos que se pueden usar para determinar el orden de las bases de nucleótidos en un ácido nucleico.

45 El término "se une específicamente", "unión específica" y similares, como se usa en el presente documento, se refiere a una o más moléculas (por ejemplo, una sonda de ácido nucleico o cebador, anticuerpo, etc.) que se une a otra molécula, dando como resultado la generación de una señal positiva estadísticamente significativa en las condiciones de ensayo designadas. Típicamente, la interacción dará como resultado posteriormente una señal detectable que es al menos el doble de la desviación estándar de cualquier señal generada como resultado de interacciones no deseadas (fondo).

50 El término "valor de la probabilidad" se refiere a cualquier valor conseguido calculando directamente la probabilidad o cualquier valor que se pueda correlacionar o que, de otro modo, pueda ser indicativo de una probabilidad.

65

El término "valor de la probabilidad" se refiere a cualquier valor alcanzado al calcular directamente la probabilidad o cualquier valor que se pueda correlacionar con o que de otro modo pueda ser indicativo de una probabilidad.

La invención en general

5 La dosis cromosómica resultante de la aneuploidia fetal se puede detectar usando ácidos nucleicos de una muestra materna. Además de la determinación empírica de la frecuencia de los ácidos nucleicos de un cromosoma particular, la proporción de ácidos nucleicos fetales en la muestra materna también es útil para determinar el riesgo de aneuploidia fetal basada en la dosis cromosómica, ya que influirá en el nivel de variación que es estadísticamente significativo en términos del cálculo del riesgo. El uso de dicha información para calcular el riesgo de aneuploidia en uno o más cromosomas fetales permite obtener un resultado más exacto que refleja las diferencias biológicas entre las muestras.

Determinación de la proporción de ADN fetal en una muestra materna

15 La proporción de ADN fetal en una muestra materna se usa como parte del cálculo del riesgo de la presente invención, ya que la proporción fetal proporciona información importante sobre la presencia estadística prevista de la dosis cromosómica. La variación de la presencia estadística prevista puede ser indicativa de aneuploidia fetal, y en particular una trisomía fetal o monosomía de un cromosoma particular.

20 Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para estimar el porcentaje de ADN fetal en una muestra materna, algunos de los cuales se describen a continuación. El uso de la proporción fetal como un componente del cálculo del riesgo es útil en particular en circunstancias en que el nivel de ADN fetal en una muestra materna es bajo. Además, el conocimiento del porcentaje de ADN fetal se puede usar para determinar qué análisis adicionales se pueden realizar en la muestra, si se puede realizar alguno, como puede ser el caso en un determinado límite inferior del porcentaje de ADN fetal en el que un sistema no puede realizar análisis de manera fiable. En otros aspectos, determinar la proporción de ADN fetal en una muestra materna puede afectar adicionalmente al nivel de certeza o poder en la detección de una aneuploidia fetal.

30 Aunque los siguientes procedimientos se describen para la determinación de una proporción total de contenido fetal en una muestra materna, la proporción también se puede determinar cromosoma por cromosoma. Por ejemplo, la información de frecuencia para el cromosoma fetal 21 se puede determinar en comparación con el cromosoma fetal 18. En otro ejemplo, se pueden usar dos o más cromosomas para detectar una proporción fetal, por ejemplo, se puede usar la frecuencia de loci en los cromosomas 1 y 2. En determinados aspectos, el cromosoma usado para determinar la proporción fetal es el cromosoma interrogado para una posible aneuploidia. En otro aspecto, el(los) cromosoma(s) usado(s) para determinar la proporción fetal no es(son) específicamente el cromosoma interrogado para una posible aneuploidia.

Determinación del contenido de ADN fetal en una muestra materna usando secuencias específicas de Y.

40 En circunstancias en que el feto es masculino, el porcentaje de ADN fetal en una muestra se puede determinar a través de la detección de ácidos nucleicos específicos de Y y comparar con el contenido de ADN materno. Por ejemplo, se pueden determinar cantidades de un ácido nucleico específico de Y amplificado, tal como una región del gen Y de la región determinante del sexo (SRY), que está situado en el cromosoma Y y, por tanto, es representativo del ADN fetal en esta circunstancia, y compararlas con una o más regiones genómicas amplificadas que están presentes tanto en el ADN materno como en el ADN fetal (regiones genómicas que preferentemente no son de un cromosoma que se cree que posiblemente sea aneuploide en el feto, por ejemplo, una región autosómica que no esté en el cromosoma 21, 18 o 13).

50 En otro ejemplo, la concentración de ADN fetal en una muestra se calcula usando procedimientos que tienen en cuenta el pequeño porcentaje de ADN materno de fondo que se puede identificar incorrectamente como originado en el cromosoma Y. Específicamente, usando determinados algoritmos bioinformáticos, un pequeño número de moléculas de ADN se identifican incorrectamente como originadas en el cromosoma Y en embarazos con fetos femeninos (véase, Chiu, *et al.*, PNAS USA, 105:20458-63 (2008)). El valor de %chrY en un embarazo con un feto masculino es, por tanto, un compuesto de la cantidad de secuencias del cromosoma Y aportadas por el feto masculino y aquellas secuencias del ADN de fondo materno que se asignan incorrectamente al cromosoma Y. En consecuencia, en determinados aspectos, la concentración de ADN fetal se puede derivar más correctamente de la ecuación: %chrY = 0,157F + 0,007(1-F) (véase, Chiu, *et al.*, BMJ, 342:c7401 (2011)).

60 En un aspecto preferente, se produce ADN amplificado a partir de ADN extracelular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden usar otros mecanismos de amplificación, como será evidente para un experto en la técnica tras leer la presente divulgación, incluyendo los descritos con más detalle en el presente documento. En aspectos particulares, el porcentaje de ADN fetal extracelular en la muestra materna se puede determinar mediante PCR utilizando ADN diluido en serie aislado de la muestra materna, que puede cuantificar con exactitud el número de genomas que comprenden los genes amplificados. Por ejemplo, si una muestra de sangre contiene un 100 % de ADN fetal masculino y se realizan diluciones en serie 1:2, en promedio la señal de

SRY desaparecerá 1 dilución antes de una señal autosómica, ya que hay 1 copia del gen *SRY* y 2 copias de un gen autosómico.

En un aspecto específico, el porcentaje de ADN fetal extracelular en el plasma materno se calcula usando la siguiente fórmula: porcentaje de ADN fetal extracelular = $(n.^{\circ} \text{ de copias del gen } SRY \times 2 \times 100) / (n.^{\circ} \text{ de copias de gen autosómico})$, donde el número de copias de cada gen se determina observando la dilución en serie más alta en la que se detectó el gen. La fórmula contiene un factor de multiplicación de 2, que se usa para normalizar el hecho de que solo hay 1 copia del gen *SRY* en comparación con dos copias del gen autosómico en cada genoma, fetal o materno.

Determinación del contenido de ADN fetal en una muestra materna usando loci informativos autosómicos.

El ADN de un feto tendrá aproximadamente un 50 % de sus loci heredados de la madre y aproximadamente un 50 % de sus loci heredados del padre. La determinación de qué loci genéticos se aportan al feto a partir de fuentes no maternas (loci informativos) permite la estimación de la proporción de ADN fetal en una muestra materna y, por tanto, proporciona información usada para calcular diferencias estadísticamente significativas en las dosis cromosómicas para los cromosomas de interés.

En determinados aspectos, la determinación de polimorfismos fetales requiere un análisis de mutaciones y/o SNP dirigido para identificar la presencia de ADN fetal en una muestra materna. En algunos aspectos, se puede usar genotipado previo del padre y/o la madre. Por ejemplo, los padres se pueden haber sometido a una determinación del genotipo para identificar marcadores de enfermedad, por ejemplo, marcadores para trastornos tales como la fibrosis quística, la distrofia muscular, la atrofia muscular espinal o incluso el estado del gen RhD. Las diferencias en los polimorfismos, las variantes del número de copias o las mutaciones se pueden usar para determinar el porcentaje de contribución fetal en una muestra materna.

En un aspecto preferente, el porcentaje de ADN extracelular fetal en una muestra materna se puede cuantificar usando detección multiplexada de SNP sin el conocimiento previo del genotipo materno o paterno. En este aspecto, se usan dos o más regiones de ácido nucleico polimórfico seleccionadas con un SNP conocido en cada región. En un aspecto preferente, las regiones de ácido nucleico polimórficas seleccionadas están situadas en un cromosoma autosómico que es poco probable que sea aneuploide, por ejemplo, no los cromosomas 21, 18 o 13. Las regiones de ácido nucleico polimórficas seleccionadas de la muestra materna (por ejemplo, plasma) se amplifican. En un aspecto preferente, la amplificación es universal; y en un modo de realización preferente, las regiones de ácido nucleico polimórficas seleccionadas se amplifican en una reacción en un recipiente. Se determina y cuantifica cada alelo de las regiones de ácido nucleico polimórfico seleccionadas en la muestra materna. En un aspecto preferente, se usa la secuenciación de alto rendimiento para dicha determinación y cuantificación.

Por tanto, los loci se identifican donde los genotipos maternos y fetales son diferentes; por ejemplo, el genotipo materno es homocigoto y el genotipo fetal es heterocigoto. Esta identificación de loci informativos se consigue observando una frecuencia alta de un alelo (>80 %) y una frecuencia baja (<20 % y >0,15 %) del otro alelo para una región de ácido nucleico seleccionada en particular. El uso de múltiples loci es, en particular, ventajoso ya que reduce la cantidad de variación en la medición de la abundancia de los alelos entre los loci. Todos o un subconjunto de los loci que cumplen con este requisito se usan para determinar la contribución fetal a través del análisis estadístico. En un aspecto, la contribución fetal se determina sumando los alelos de frecuencia baja de dos o más loci conjuntamente, dividiendo entre la suma de los alelos de frecuencia baja y alta y multiplicando por dos.

Para muchos alelos, las secuencias maternas y fetales pueden ser homocigotas e idénticas, y como esta información no distingue, por lo tanto, entre el ADN materno y fetal, no es útil para determinar el porcentaje de ADN fetal en una muestra materna. La presente invención utiliza información alélica donde existe una diferencia distinguible entre el ADN fetal y materno (por ejemplo, un alelo fetal que contiene al menos un alelo que difiere del alelo materno) en los cálculos del porcentaje de ADN fetal. Los datos pertenecientes a regiones alélicas que son iguales para el ADN materno y fetal no se seleccionan, por tanto, para el análisis, o se eliminan de los datos pertinentes antes de la determinación de la proporción de ADN fetal para no enmascarar los datos útiles. Se pueden encontrar procesos ejemplares adicionales para cuantificar el ADN fetal en plasma materno, por ejemplo, en Chu, *et al.*, Prenat. Diagn., 30:1226-29(2010).

En un aspecto, se pueden excluir datos de regiones de ácido nucleico seleccionadas si los datos de la región parecen ser un valor atípico debido a un error experimental o por un sesgo genético idiopático dentro de una muestra particular. En otro aspecto, los datos seleccionados de determinadas regiones de ácido nucleico se pueden someter a ajustes estadísticos o matemáticos, tales como normalización, estandarización, agrupación o transformación antes de la suma o el cálculo del promedio. En otro aspecto, los datos de regiones de ácido nucleico seleccionadas se pueden someter tanto a normalización como a exclusión de errores experimentales de los datos antes de la suma o el cálculo del promedio.

En un aspecto preferente, se usan datos de 12 o más regiones de ácido nucleico o loci para el análisis. En otro aspecto preferente, se usan datos de 24 o más regiones de ácido nucleico o loci para el análisis. En otro aspecto preferente, se usan datos de 48 o más loci para el análisis. En otro aspecto, se usan uno o más índices para identificar la muestra, el locus, el alelo o la identificación del ácido nucleico. Dichos índices son como se describen en las solicitudes en trámite US2013040375 y US2012040859.

En un aspecto preferente, el porcentaje de contribución fetal en una muestra materna se cuantifica usando detección de SNP en tándem en los alelos maternos y fetales. Las técnicas para identificar SNP en tándem en ADN extraído de una muestra materna se describen en Mitchell *et al.*, patente de EE. UU. n.º 7.799.531 y las solicitudes de patente de EE. UU. n.º US2010184043, US2010184044, US2011117548 y US2011059451. Estas referencias describen la diferenciación de los loci fetales y maternos a través de la detección de al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en tándem en una muestra materna que tiene un haplotipo diferente entre el genoma fetal y el materno. La identificación y cuantificación de estos haplotipos se pueden realizar directamente en la muestra materna y se pueden usar para determinar la proporción fetal de ácidos nucleicos en la muestra materna.

Determinación del contenido de ADN fetal en una muestra materna usando proporciones alélicas epigenéticas.

Se ha identificado que determinados genes tienen diferencias epigenéticas entre el feto y la madre, y dichos genes son loci candidatos para marcadores de ADN fetal en una muestra materna. Véase, por ejemplo, Chim, *et al.*, PNAS USA, 102:14753-58(2005). Estos loci, que no están metilados en el feto pero están metilados en las células de la sangre materna, se pueden detectar fácilmente en el plasma materno. La comparación de productos de amplificación metilados y no metilados de una muestra materna se puede usar para cuantificar el porcentaje de contribución del ADN fetal a la muestra materna calculando la proporción alélica epigenética para una o más de dichas secuencias conocidas por estar metiladas de forma diferencial en el ADN fetal en comparación con el ADN materno.

Para determinar el estado de metilación de los ácidos nucleicos en una muestra materna, los ácidos nucleicos de la muestra se someten a conversión de bisulfito. Los procesos convencionales para dicha conversión de bisulfito incluyen, pero no se limitan a, el uso de kits disponibles comercialmente tales como el kit de modificación de ADN Methylamp™ (Epigentek, Brooklyn, NY). Las frecuencias y proporciones alélicas se pueden calcular directamente y exportar a partir de los datos para determinar el porcentaje de ADN fetal en la muestra materna.

Estimación empírica de la dosis cromosómica

La dosis de cromosomas fetales usada en el cálculo del cociente de posibilidades se puede estimar usando una variedad de técnicas. Los procesos de detección incluyen la detección polimórfica, tal como detección por SNP de ácidos nucleicos específicos, o preferentemente detección no polimórfica basada en secuencias fetales y maternas, y preferentemente secuencias no polimórficas conservadas entre la madre y el feto. Estos procedimientos de detección pueden determinar tanto la dosis de un cromosoma particular como la proporción total de ácidos nucleicos fetales en una muestra materna en relación con la contribución materna.

Al estimar la dosis cromosómica, dichas mediciones de frecuencia son preferentemente frecuencias totales del ácido nucleico seleccionado en la muestra, independientemente de la fuente, y, por tanto, no se requiere que los ácidos nucleicos seleccionados se distingan como provenientes de una fuente materna o fetal antes de su uso en el cálculo del cociente de posibilidades.

En algunos aspectos, se pueden seleccionar ácidos nucleicos de una muestra materna antes de la detección, es decir, se pueden aislar selectivamente de una muestra materna antes de la detección usando técnicas de amplificación o captura, tales como hibridación. En otro aspecto específico, los ácidos nucleicos usados en la estimación de la dosis cromosómica se pueden seleccionar después de la detección, por ejemplo, filtrando los datos de frecuencia generados por técnicas tales como secuenciación aleatoria paralela masiva de ácidos nucleicos dentro de la muestra materna.

En algunos aspectos específicos, la estimación de la dosis cromosómica emplea procedimientos de secuenciación selectiva que interrogan loci específicos de cada cromosoma, permitiendo una secuenciación altamente multiplexada de loci seleccionados de cromosomas específicos de interés. La secuenciación selectiva de cromosomas se puede usar para someter a ensayo simultáneamente loci polimórficos y no polimórficos en una sola reacción, permitiendo la estimación tanto de la dosis cromosómica como de la proporción fetal de ácidos nucleicos fetales en la muestra materna. Posteriormente, se puede emplear un novedoso cálculo del riesgo de la invención, que aprovecha las estimaciones de la dosis cromosómica y de la proporción fetal para calcular la probabilidad de aneuploidia fetal (por ejemplo, trisomía fetal) en cada sujeto.

En un aspecto, la presente invención utiliza el análisis de segmentos de ADN aleatorios, tal como el que se describe en, por ejemplo, Quake *et al.*, patentes de EE. UU. n.º 8.008.018 y 7.888.017, y Shoemaker *et al.*, para estimar la dosis cromosómica (aneuploidia). Brevemente, la cantidad de ácidos nucleicos dentro de una muestra

mixta, tal como una muestra materna, se puede detectar diferencialmente usando secuencias de ácido nucleico seleccionadas. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN genómicos, y preferentemente son ARNm. En el caso del ARNm, se pueden elegir secuencias diana correspondientes a genes que están altamente expresados en el feto. Los ácidos nucleicos en cada muestra se detectan con una o más sondas específicas de secuencia dirigidas a al menos una de dos secuencias diana en los ácidos nucleicos para obtener un producto de reacción detectable. Una sonda específica para un cromosoma interrogado se combina con la muestra de reacción, junto con una sonda de control específica para otro cromosoma (por ejemplo, no interrogado). En la mayoría de los casos, los productos de reacción serán de ácidos nucleicos maternos, pero un pequeño número de productos de reacción será de ácidos nucleicos fetales. Para distinguir la variación aleatoria de los resultados fetales, se ejecutan un gran número de reacciones y se aplican procesos estadísticos a los resultados. El marcado y la detección en el presente proceso se usan para distinguir la presencia o ausencia de una única secuencia diana, denominada "análisis digital", aunque se puede realizar con procesos de detección de ácido nucleico sensibles que distinguen entre una y más de una secuencia diana en una muestra aislada.

En otro ejemplo, se usa secuenciación paralela masiva de ácidos nucleicos (por ejemplo, fragmentos de ADN seleccionados al azar de la muestra) para determinar la secuencia de los ácidos nucleicos en la muestra materna para determinar la frecuencia seleccionada de los ácidos nucleicos dentro de la muestra materna. Para la detección de una anomalía en la frecuencia de cromosomas (por ejemplo, una trisomía), los ácidos nucleicos secuenciados se identifican como provenientes de un primer cromosoma, y las cantidades totales de ácidos nucleicos de al menos un primer cromosoma en la muestra materna se comparan con las cantidades totales de ácidos nucleicos de al menos un segundo cromosoma en la muestra materna. Las cantidades totales de ácidos nucleicos incluyen los ácidos nucleicos tanto del feto como de la madre en la muestra materna, y los ácidos nucleicos del feto no se diferencian de los maternos al determinar la frecuencia de los ácidos nucleicos correspondientes a la frecuencia de cromosomas. Cuando se presume que un primer cromosoma es euploide, y se sospecha que el segundo cromosoma es aneuploide, se comparan los números totales de ácidos nucleicos para el primer y segundo cromosomas para determinar la presencia o ausencia de dicha aneuploidia.

En aspectos más específicos, las muestras utilizadas para secuenciación masivamente paralela de ácidos nucleicos se enriquecen para regiones polimórficas. Las técnicas ejemplares para realizar el enriquecimiento incluyen las divulgadas en, por ejemplo, el documento WO2011091063, el documento WO2011091046 y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 20110230358. Brevemente, una parte de una muestra materna que comprende ADN extracelular se amplifica para aumentar el número de copias de la una o más secuencias polimórficas en la muestra, y las partes amplificadas de ácidos nucleicos se vuelven a añadir a continuación a la muestra original para secuenciación. De forma alternativa, la muestra se somete a secuenciación del genoma completo para obtener una pluralidad de etiquetas de secuencia, y las secuencias de las etiquetas se comparan con la secuencia de polimorfismos de referencia múltiples.

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se secuencian usando procesos de hibridación basados en matrices, tales como los descritos en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2011/0172111. En otros aspectos, las biomoléculas se detectan usando tecnología de detección de nanoporos, tal como las descritas en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2011/0124518.

En otro aspecto, los ácidos nucleicos se secuencian y se comparan usando polimorfismos que diferencian entre alelos maternos y fetales en una muestra, usando procedimientos tales como los descritos en las patentes de EE. UU. n.º 7.727.720, 7.718.370, 7.598.060, 7.442.506, 7.332.277, 7.208.274 y 6.977.162. En resumen, los procedimientos utilizan detección polimórfica para identificar anomalías cromosómicas. Se determinan secuencias en los alelos que son homocigotos en la madre y heterocigotos en el feto, y se determina una proporción para los alelos heterocigotos. La proporción para los alelos heterocigotos se usa para indicar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

Aún en otro aspecto, la estimación del riesgo de aneuploidias fetales utiliza la identificación de polimorfismos en tándem, tal como la descrita en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.799.531, y las publicaciones de EE. UU. n.º 2011/0117548, 2011/0059451, 2010/0184044, 2010/184043, y 2008/0020390. Brevemente, se detectan y usan SNP en tándem para diferenciar los alelos maternos y fetales en una muestra materna para detectar anomalías cromosómicas fetales a través de la comparación del ADN materno con el ADN fetal.

En un aspecto preferente, la estimación de la dosis cromosómica utiliza una amplificación seleccionada de loci representativos. Dichas técnicas se divulgan, por ejemplo, en las solicitudes de EE. UU. n.º US2012034603, US2013040375, US2012040859 y US2012034685. Estas técnicas utilizan la detección de regiones genómicas usando oligonucleótidos de secuencia fija y uniendo los oligonucleótidos de secuencia fija por medio de ligado y/o extensión. Esto se puede lograr usando una combinación de ligado y amplificación, por ejemplo, el ligado de dos o más oligonucleótidos de secuencia fija y opcionalmente un oligonucleótido en puente que es complementario de una región entre los oligonucleótidos de secuencia fija. En otro ejemplo, esto se puede lograr usando una combinación de extensión, ligado y amplificación.

En algunos aspectos, las estimaciones de la dosis cromosómica y las variaciones para la población normal se determinan a partir de muestras normales que tienen una proporción similar de ADN fetal. Por ejemplo, una dosis cromosómica prevista para trisomía en una muestra de ADN con un porcentaje específico de ADN extracelular fetal se puede calcular sumando el porcentaje de contribución del cromosoma aneuploide. La dosis cromosómica para la muestra se puede comparar a continuación con la dosis cromosómica para un feto normal y con la dosis cromosómica prevista si el triploide se determina estadísticamente, usando la variación de la dosis cromosómica, si la muestra es más probable que sea normal o triploide, y la probabilidad estadística de que sea una o la otra.

Las regiones de ácido nucleico seleccionadas para el análisis en la muestra materna incluyen en una sola reacción ambas regiones de ácido nucleico para la determinación del porcentaje de contribución fetal, así como regiones de ácido nucleico correspondientes a dos o más cromosomas usadas para detectar una anomalía en la dosis cromosómica. El uso de una única reacción ayuda a minimizar el riesgo de contaminación o sesgo que se puede introducir usando reacciones separadas, que de otro modo pueden distorsionar los resultados. De hecho, los procedimientos de la presente invención se realizan como reacciones multiplexadas o incluso altamente multiplexadas, donde se interrogan los loci tanto polimórficos como no polimórficos (para determinar el porcentaje de contribución fetal y la dosis cromosómica, respectivamente) en una única reacción para cada muestra. En modos de realización preferentes, se usan los ensayos de multiplexación descritos en las solicitudes de EE. UU. n.º US2012034603, US2013040375, US2012040859 y US2012034685, ya que estos ensayos interrogan loci tanto polimórficos como no polimórficos en una muestra materna en una única reacción multiplexada.

En otros aspectos, se pueden interrogar una o más regiones de ácido nucleico seleccionadas tanto para la determinación de la proporción de ácido nucleico fetal como para la detección de aneuploidias fetales. La utilización de las mismas regiones tanto para el porcentaje de contribución fetal como para la detección de aneuploidias fetales ayuda además a minimizar el sesgo debido a error experimental o contaminación.

Implementación informática de los procesos de la invención

La figura 1 es un diagrama de bloques que ilustra un entorno de sistema ejemplar en el que los procesos de la presente invención se pueden implementar para calcular los valores pertinentes. El sistema 10 incluye un servidor 14 y un ordenador 16. El ordenador 16 puede estar en comunicación con el servidor 14 a través de la misma red o diferente.

De acuerdo con el modo de realización ejemplar, el ordenador 16 ejecuta un componente de programa informático 24 que calcula la proporción fetal y aplica esta información a los valores de la dosis de regiones genómicas y/o cromosomas. En un modo de realización, el ordenador 16 puede comprender un ordenador personal, pero el ordenador 16 puede comprender cualquier tipo de máquina que incluya al menos un procesador y una memoria.

La salida del componente de programa informático 24 comprende un informe 26 con un valor de probabilidad de que una región genómica y/o un cromosoma tenga una anomalía de dosis. En un aspecto preferente, este informe es un cociente de posibilidades de un valor de la probabilidad de que una región o un cromosoma tenga dos copias (por ejemplo, sea disómica) y un valor de la probabilidad de que una región o un cromosoma tenga más copias (por ejemplo, sea trisómica) o menos copias (por ejemplo, sea monosómica). El informe 26 puede ser en papel, es decir, impreso, o electrónico, que se puede visualizar en un monitor y/o comunicar electrónicamente a usuarios por correo electrónico, FTP, mensajes de texto, publicado en un servidor y similares.

Aunque el proceso de normalización de la invención se muestra como implementado como programa informático 24, también se puede implementar como una combinación de hardware y programa informático. Además, el programa informático 24 para la normalización se puede implementar como componentes múltiples que funcionan en el misma o diferentes ordenadores.

Tanto el servidor 14 como el ordenador 16 pueden incluir componentes de hardware de dispositivos informáticos típicos (no mostrados), incluyendo un procesador, dispositivos de entrada (por ejemplo, teclado, dispositivo señalador, micrófono para comandos de voz, botones, pantalla táctil, etc.) y dispositivos de salida (por ejemplo, un dispositivo de visualización, altavoces y similares). El servidor 14 y el ordenador 16 pueden incluir medios legibles por ordenador, por ejemplo, dispositivos de memoria y almacenamiento (por ejemplo, memoria flash, disco duro, unidad de disco óptico, unidad de disco magnético y similares) que contienen instrucciones de ordenador que implementan la funcionalidad divulgada cuando se ejecuta por el procesador. El servidor 14 y el ordenador 16 pueden incluir además interfaces de comunicación de redes por cable o inalámbricas para comunicación.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que

los autores de la presente invención consideran su invención, ni pretenden representar o implicar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Por lo tanto, los presentes aspectos se deben considerar en todos los aspectos como ilustrativos y no restrictivos.

- 5 La eficiencia y la exactitud de la identificación de aneuploidias usando el cálculo de cocientes de posibilidades de la presente invención se demuestra en los ejemplos a continuación, donde, en una cohorte enmascarada de 167 mujeres embarazadas, que incluía 36 embarazos con T21 y 8 con T18, los procedimientos discriminaron correctamente todos los casos con T21 y T18 de los casos euploides.

10 **Ejemplo 1: Sujetos**

Se incluyeron sujetos de forma prospectiva tras proporcionar un consentimiento informado según los protocolos aprobados por los comités de ética de la investigación. Los sujetos debían tener al menos 18 años de edad, al menos 10 semanas de edad gestacional y tener embarazos únicos. Se seleccionó para su inclusión en este estudio a un subconjunto de sujetos incluidos, que consistía en 250 mujeres con embarazos disómicos, 72 mujeres con embarazos con trisomía 21 (T21) y 16 mujeres con embarazos con trisomía 18 (T18). Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a una primera cohorte que consistía en 127 embarazos disómicos, 36 embarazos con T21 y 8 embarazos con T18, y a una segunda cohorte que consistía en 123 embarazos disómicos, 36 embarazos con T21 y 8 embarazos con T18. El estado de trisomía de cada embarazo se confirmó mediante pruebas invasivas (hibridación *in situ* fluorescente y/o análisis del cariotipo). El estado de trisomía de la primera cohorte era conocido en el momento del análisis; en la segunda cohorte, el estado de la trisomía estuvo enmascarado hasta después del análisis del cálculo del riesgo.

La figura 2 es una tabla que muestra los datos demográficos de las muestras analizadas en este estudio. La media de edad materna de los sujetos disómicos, con T21 y con T18 fue 34, 34 y 37 años, respectivamente. La media de edad gestacional de los sujetos disómicos, con T21 y con T18 fue 17,7, 19,6 y 17,0 semanas. Las medias de las edades maternas de los sujetos disómicos, con T21 y con T18 no difirieron significativamente entre la primera frente a la segunda cohortes ($p > 0,05$ para todos los casos con prueba de la t). De forma similar, las medias de las edades gestacionales de los sujetos disómicos, con T21 y con T18 no difirieron significativamente entre la primera frente a la segunda cohortes ($p > 0,05$ para todos los casos con prueba de la t).

Ejemplo 2: Análisis de loci no polimórficos para estimar la dosis cromosómica

Para estimar la dosis de cromosomas fetales, se diseñaron ensayos frente a 576 loci no polimórficos en cada uno de los cromosomas 18 y 21, donde cada ensayo consistió en tres oligonucleótidos específicos del locus: un oligo izquierdo con una cola de amplificación universal en 5', un oligo intermedio fosforilado en 5' y un oligo derecho fosforilado en 5' con una cola de amplificación universal en 3'. Los loci seleccionados se usaron para calcular una métrica de dosis del chr21 y una métrica de dosis del chr18 para cada muestra. Se analizaron las muestras de la primera cohorte para identificar 384 de los 576 loci en chr21 y chr18 que podían discriminar mejor T21 y T18 de las muestras normales. En primer lugar, se normalizaron los recuentos de secuencias eliminando sistemáticamente sesgos de muestra y ensayo mediante pulido de medianas (véase Tukey, *Exploratory Data Analysis* (Addison-Wesley, Reading MA, 1977) e Irzarry, *et al.*, NAR, 31(4):e15 (2003)).

A continuación, se identificaron los 384 loci en cada cromosoma que presentaban la mayor diferencia residual entre las muestras normales y de trisomía usando estadísticos Z derivados de loci individuales para el cromosoma de prueba y los 576 loci para el cromosoma de comparación. La media de los recuentos de los 384 loci del chr21 que mejor podían discriminar T21 de lo normal se dividió entre la suma del recuento medio de los 384 del chr21 y el recuento medio de los 576 loci del chr18. Se calculó una métrica de proporción del chr18 de forma similar como la suma de los recuentos de los 384 loci del chr18 que podían discriminar mejor T18 de lo normal dividida entre la suma del recuento medio de los 576 loci del chr21 y el recuento medio de los 384 loci del chr18.

Se usó una prueba estándar de la Z de las proporciones para calcular los estadísticos Z:

$$Z_j = \frac{p_j - p_0}{\sqrt{\frac{p_j(1 - p_j)}{n_j}}}$$

donde p_j es la proporción observada para un cromosoma de interés dado en una muestra dada j , p_0 es la proporción prevista para el cromosoma de prueba dado calculada como la mediana de p_j , y n_j es el denominador de la métrica de la proporción. La estandarización del estadístico Z se realizó usando censura repetitiva. En cada repetición, se eliminaron las muestras que quedaban fuera de las medianas de las tres desviaciones absolutas. Después de diez repeticiones, se calcularon la media y la desviación estándar usando solo las muestras sin

censura. Todas las muestras se estandarizaron a continuación frente a esta media y desviación estándar. La prueba de Kolmogorov-Smirnov (véase Conover, Practical Nonparametric Statistics, págs. 295-301 (John Wiley & Sons, New York, NY, 1971)) y la prueba de Shapiro-Wilk (véase Royston, Applied Statistics, 31:115-124(1982)) se usaron para someter a prueba la normalidad de los estadísticos Z de las muestras normales.

5

Ejemplo 3: Análisis de loci polimórficos para evaluar el porcentaje de contribución fetal

Para evaluar la proporción de ácido nucleico fetal en las muestras maternas, se diseñaron ensayos frente a un conjunto de 192 loci que contienen SNP en los cromosomas 1 a 12, donde se utilizaron dos oligos intermedios diferentes en una base para consultar cada SNP. Los SNP se optimizaron para la frecuencia de alelos menor en el conjunto de datos HapMap 3. Duan, *et al.*, Bioinformatics, 3(3):139-41(2008); publicación electrónico 9 de noviembre de 2008.

10

Se diseñaron ensayos frente a 576 loci no polimórficos en cada uno de chr18 y chr21, donde cada ensayo consistió en tres oligonucleótidos específicos del locus: un oligo izquierdo con una cola de amplificación universal en 5', un oligo intermedio fosforilado en 5' y un oligo derecho fosforilado en 5' con una cola de amplificación universal en 3'. Para evaluar la fracción fetal, se diseñaron ensayos frente a un conjunto de 192 loci que contienen SNP en los chr1-12, donde se utilizaron dos oligos intermedios diferentes en una base para consultar cada SNP. Los SNP se optimizaron para la frecuencia de alelos menor en el conjunto de datos HapMap 3. Duan, *et al.*, Bioinformatics, 3(3):139-41(2008); publicación electrónico 9 de noviembre de 2008.

15

20

Se sintetizaron oligonucleótidos por IDT y se mezclaron para crear un único grupo de ensayo multiplexado. Los productos de PCR se generaron a partir de cada muestra de sujeto como se describió previamente. Brevemente, se recogieron 8 ml de sangre por sujeto en un tubo de ADN extracelular (Streck) y se almacenaron a temperatura ambiente durante hasta 3 días. El plasma se aisló de la sangre por medio de centrifugación doble y se almacenó a menos 20 °C durante hasta un año. El ADN se aisló del plasma usando perlas de purificación de ADN vírico NA (Dyna), se biotiniló, se inmovilizó en perlas de estreptavidina MyOne C1 (Dyna) y se hibridó con la mezcla de oligonucleótidos multiplexados. Los oligonucleótidos apropiadamente hibridados se catenaron con Taq ligasa, se eluyeron del ADN y se amplificaron usando cebadores de PCR universales. El producto de la PCR de 96 muestras independientes se mezcló y se usó como molde para la amplificación de grupos en un único carril de un portaobjetos de flujo TruSeq v2 SR (Illumina). El portaobjetos se procesó en un Illumina HiSeq 2000 para producir una secuencia específica de locus de 56 bases y una secuencia de etiqueta de muestra de 7 bases a partir de un promedio de 1,18 M agrupamientos/muestra. Las lecturas específicas de locus se compararon con las secuencias de locus previstas. Un promedio de 1,15 M lecturas (97 %) tuvo menos de 3 emparejamientos erróneos con las estructuras de ensayo previstas, dando como resultado un promedio de 854 lecturas/locus/muestra.

25

30

35

Se definieron loci polimórficos informativos como loci donde los alelos fetales diferían de los alelos maternos. Debido a que el ensayo presenta especificidades para alelos que exceden de un 99 %, los loci informativos se identificaron fácilmente cuando la proporción para un alelo fetal de un locus se midió entre un 1 y un 20 %. Se estimó una probabilidad máxima usando una distribución binomial, tal como la descrita en la solicitud en trámite US2013024127, para determinar la proporción fetal más probable basada en las mediciones de varios loci informativos. Los resultados se correlacionaron bien (R2 >0,99) con el enfoque de promedio ponderado presentado por Chu y colaboradores (véase, Chu, *et al.*, Prenat. Diagn., 30:1226-29(2010)).

40

45

Ejemplo 4: Detección de aneuploidia usando el cálculo del riesgo

El riesgo de aneuploidia se calculó utilizando un cociente de posibilidades que compara un modelo que supone un cromosoma fetal disómico y un modelo que supone un cromosoma fetal trisómico. La distribución de las diferencias en las proporciones observadas y de referencia se evaluó usando distribuciones normales con una media de 0 y una desviación estándar estimada usando simulaciones de Monte Carlo que se extraen aleatoriamente de los datos observados. Para el modelo disómico, se usó p0 como la proporción de referencia prevista en las simulaciones. Para el modelo trisómico, p0 se ajustó por muestra con la proporción de referencia ajustada por la proporción fetal \hat{p}_j , definida como

50

55

$$\hat{p}_j = \frac{(1 + 0,5f_j)p_0}{((1 + 0,5f_j)p_0) + (1 - p_0)}$$

donde f_j era la proporción fetal para la muestra j. Este ajuste explica el aumento previsto de la representación de un cromosoma de prueba cuando el feto era trisómico. En las simulaciones, tanto p0 como f_j se eligieron al azar de distribuciones normales usando sus estimaciones de la media y el error estándar para tener en cuenta las variaciones de medición. Las simulaciones se ejecutan 100 000 veces. La puntuación de riesgo se definió como

60

la media de trisomía frente al cociente de posibilidades de disomía obtenido de las simulaciones, ajustado multiplicando el riesgo de trisomía asociado con la edad materna y gestacional del sujeto.

Ejemplo 5: Resultados

5 Determinación de los estadísticos Z de la proporción de cromosomas. Para seleccionar los loci que se iban a usar para la detección de aneuploidia, se evaluaron los sujetos de la primera cohorte, ya que se conocía su estado de aneuploidia. Seis muestras normales, una con T18 y una con T21 (8/171, o un 5 %) no cumplieron con los criterios de QC (recuento bajo, proporción fetal <3 %, y/o evidencia de SNP de un embarazo único) y se eliminaron del conjunto de datos. Se calcularon estadísticos Z de la proporción de cromosomas en las muestras restantes para chr18 y chr21 (Figuras 3A y 3B). 120/121 (99,2 %) muestras disómicas tenían estadísticos Z <3; una muestra disómica tenía un estadístico Z para chr21 de 3,5. 35/35 (100 %) muestras con T21 y 7/7 (100 %) con T18 tuvieron estadísticos Z de la proporción de cromosomas >3. Por tanto, usando el análisis de estadísticos Z, el sistema de ensayo utilizado en la presente invención presentó una especificidad de un 99,2 % y una sensibilidad de un 100 % para T21, y una especificidad de un 100 % y una sensibilidad de un 100 % para T18.

20 Para medir la proporción fetal de manera fiable, se incorporaron 192 ensayos dirigidos a SNP en un grupo de ensayos multiplex. Midiendo la proporción fetal y la proporción de cromosomas en la misma reacción, se aseguró que las estimaciones de la proporción fetal a partir de ensayos polimórficos representaran estrechamente la proporción fetal en los ensayos no polimórficos usados para evaluar la proporción de cromosomas. La proporción fetal presentó una fuerte correlación ($R^2 > 0,90$) con el estadístico Z de la proporción de cromosomas en embarazos aneuploides (figuras 3A y 3B).

25 De manera importante, el estadística Z no era sensible para la proporción fetal en embarazos normales, lo que refleja una limitación importante de la métrica del estadístico Z: las muestras con valores de estadístico Z bajos surgen tanto de muestras euploides como de muestras aneuploides con una proporción fetal modesta. Se razonó que sería preferente una métrica que fuera sensible a la proporción fetal en embarazos euploides y aneuploides. Por tanto, se desarrolló un cálculo del riesgo que aprovecha la información de la proporción fetal para (1) definir las dosis cromosómicas previstas para los cromosomas de prueba trisómicos frente a disómicos, y (2) calcular las probabilidades de que una muestra pertenezca a uno u otro grupo.

35 Análisis de cohorte usando el cálculo del riesgo. El cálculo del riesgo se usó para calcular las probabilidades de trisomía frente a disomía de chr18 y chr21 en cada muestra dentro de la primera cohorte (figuras 4A y 4B). Como se esperaba, las probabilidades de cálculo del riesgo de la presente invención demostraron una respuesta a la proporción fetal en muestras tanto trisómicas como disómicas, y la magnitud de la respuesta fue aproximadamente equivalente en los dos grupos. El cálculo del riesgo de la presente invención discriminó correctamente todas las muestras euploides de las aneuploides, y la diferencia entre las probabilidades más bajas de aneuploides y las probabilidades de euploides excedió de 1012. Todas las muestras de aneuploidia tenían probabilidades >1010.

40 Segundo análisis del cálculo del riesgo en una cohorte con enmascaramiento. Para someter a prueba el rendimiento del ensayo y el cálculo del riesgo de la presente invención en un conjunto independiente de sujetos, se sometió a ensayo una segunda cohorte con enmascaramiento que consistía en 123 embarazos normales, 36 con T21 y 8 con T18. Todas las muestras pasaron los criterios de QC y se asignaron puntuaciones de probabilidad del cálculo del riesgo para chr18 y chr21 (figuras 5A y 5B). Como se indica anteriormente, el cálculo del riesgo de la presente invención discriminó correctamente todos los sujetos con trisomía de los sujetos con disomía. La diferencia entre las probabilidades de aneuploides más bajas y las probabilidades de euploides más altas fue de 103,9. Las 36 muestras con T21 y las 8 muestras con T18 tenían probabilidades de trisomía que excedían de 102,67 (>99,8 % de riesgo de trisomía).

45 Las pruebas de detección de aneuploidia prenatal actuales emplean umbrales de riesgo de aproximadamente 1 en 300 (10-2,5) para la derivación a pruebas invasivas. Si este umbral se aplicara a las probabilidades del cálculo del riesgo para la cohorte con enmascaramiento, produciría una especificidad de un 99,2% y una sensibilidad de un 100 % para cada cromosoma. Esto se compara favorablemente con los procedimientos de detección actuales, que pueden conllevar una tasa de falsos positivos de un 5 % y de falsos negativos de un 10 %. Además, debido a que la diferencia mínima entre las probabilidades del cálculo del riesgo de los sujetos euploides y aneuploides fue de casi cuatro órdenes de magnitud para T21 y catorce órdenes de magnitud para T18, una variedad de umbrales produce una sensibilidad y especificidad perfectas.

60 Generando un molde de secuenciación a partir de ensayos específicos de cromosoma y produciendo altas tasas de asignación, el ensayo selectivo para el cromosoma empleado en el presente documento permite la detección de aneuploidia usando ~1 M de lecturas sin procesar por sujeto, permitiendo el análisis de 96 sujetos por carril secuenciación. Por el contrario, MPSS evalúa el genoma completo y requiere ~25 M de lecturas sin procesar por sujeto, lo que limita el rendimiento de la secuenciación a 4-6 muestras por carril. Por tanto, los procedimientos actuales que emplean ensayos selectivos para cromosomas e interrogación simultánea de loci polimórficos y no

65

polimórficos en reacciones multiplexadas disfrutaron de una ventaja >20 veces mayor que MPSS en el coste y rendimiento de la secuenciación.

La capacidad del presente ensayo para genotipar loci polimórficos individuales permite la determinación simultánea de la proporción fetal y la proporción de cromosomas. La información sobre la proporción fetal se aprovechó al imponer un requisito de CQ para que cada muestra tenga al menos un 3 % de ADN fetal, evitando de este modo las lecturas de baja confianza que surgen de bajas proporciones de ADN fetal. Además, el algoritmo de cálculo del riesgo se desarrolló para producir una puntuación de riesgo dependiente de la proporción fetal que indica las probabilidades de que una muestra sea trisómica frente a disómica.

El análisis del cálculo del riesgo de la presente invención difiere del análisis del estadístico Z de la proporción de cromosomas en varios aspectos importantes. En primer lugar, debido a que las 96 muestras se procesan en un solo lote/carril, el cálculo del riesgo aprovecha las varianzas observadas dentro y entre las muestras en un carril, en lugar de estimar la varianza basada en la información obtenida de un conjunto de datos de referencia previamente analizado. Por tanto, el cálculo del riesgo de la presente invención es menos susceptible a una desviación del proceso y no requiere muestras de referencia externas o ajustes de normalización basados en información histórica.

En segundo lugar, el cálculo del riesgo empleado en el presente documento es sensible a la proporción fetal tanto en el estado trisómico como en el estado disómico, mientras que el estadística Z solo es sensible a la proporción fetal en el estado trisómico. Como consecuencia, el cálculo del riesgo de la presente invención produce una mejor separación general de las muestras trisómicas frente a las muestras disómicas. Además, debido a que las muestras con una proporción fetal baja producen probabilidades con magnitudes más bajas tanto en muestras disómicas como trisómicas, el cálculo del riesgo de la presente invención comunica una comprensión más exacta de la confianza con la que se realiza una lectura en muestras disómicas así como en muestras trisómicas.

En tercer lugar, debido a que el riesgo de aneuploidia varía significativamente con la edad materna y gestacional, y debido a que la incorporación de estos riesgos es una práctica estándar al informar de los resultados de la prueba de detección, el cálculo del riesgo de la presente invención está diseñado para adaptarse a la incorporación de riesgos relacionados con la edad. Específicamente, debido a que tanto el riesgo calculado a partir del ensayo selectivo para cromosomas como el riesgo relacionado con la edad reflejan las probabilidades de un sujeto de trisomía frente a disomía, estos componentes de riesgo se combinan fácilmente. Por el contrario, el estadístico Z refleja la probabilidad de que una muestra sea disómica y, por lo tanto, no se combina fácilmente con los riesgos relacionados con la edad de trisomía frente a disomía. Una consecuencia de esta deficiencia es que el estadística Z presentará un rendimiento diferente dependiendo de la edad del sujeto. Por ejemplo, un sujeto de 18 años de edad a las 12 semanas de gestación y con un estadístico Z de 3 es -38 veces más probable que sea un falso positivo que un sujeto de 44 años de edad a las 12 semanas de gestación y con la misma puntuación.

Los ensayos selectivos para cromosomas usados en el presente documento permiten una secuenciación altamente multiplexada de loci polimórficos y no polimórficos de cromosomas específicos de interés en hasta 96 muestras simultáneamente. El cálculo del riesgo de la presente invención analiza la dosis cromosómica resultante y la información de la proporción fetal para proporcionar una evaluación individualizada del riesgo de trisomía frente a disomía que se puede combinar con otra información de riesgo. En este estudio, los procedimientos de cálculo del riesgo de la invención discriminaron correctamente todos los casos de T21 y T18 de los casos euploides tanto en una primera cohorte como en una segunda cohorte con enmascaramiento.

Ejemplo 6: Detección de aneuploidia

El algoritmo de cálculo del riesgo usado en el cálculo del riesgo estimado de aneuploidia usó un cociente de posibilidades que comparó un modelo matemático que supone un cromosoma fetal disómico y un modelo matemático que supone un cromosoma fetal trisómico. Cuando se usa $x_j = p_j - p_0$ para describir la diferencia de la proporción observada p_j para la muestra ⁱ y la proporción de referencia estimada p_0 , se calculó el algoritmo de cálculo del riesgo usado:

$$\frac{P(x_j | T)}{P(x_j | D)}$$

donde T era el modelo trisómico y D el modelo disómico. El modelo disómico D fue una distribución normal con una media de 0 y una desviación estándar específica de la muestra estimada por simulaciones de Monte Carlo como se describe a continuación. El modelo trisómico T también fue una distribución normal con una media de 0, determinada por transformación de x_j en $\hat{x}_j = p_j - \hat{p}_j$, la diferencia entre la proporción observada y la proporción de referencia ajustada por la fracción fetal como se define por:

$$\hat{p}_j = \frac{(1 + 0,5f_j)p_0}{(1 + 0,5f_j)p_0 + (1 - p_0)}$$

5 donde f_j era la fracción fetal para la muestra j . Este ajuste explica el aumento previsto de la representación de un cromosoma fetal trisómico. Se utilizaron simulaciones de Monte Carlo para estimar desviaciones estándar específicas de la muestra para modelos disómicos y trisómicos de diferencias de proporción. Las proporciones observadas para cada muestra se simularon mediante un muestreo con reposición no paramétrico de loci y medios de cálculo, o un muestreo paramétrico de una distribución normal usando las estimaciones de la media y el error estándar para cada cromosoma a partir de los de los recuentos de loci no polimórficos observados. De forma similar, la proporción de referencia p_0 y la fracción fetal f_j se simularon mediante un muestreo no paramétrico de muestras y loci polimórficos, respectivamente, o se seleccionaron a partir de distribuciones normales usando sus estimaciones de la media y el error estándar para tener en cuenta las varianzas de la medición. En este estudio se usó un muestreo paramétrico. Las simulaciones se ejecutaron 100 000 veces y se calcularon las diferencias de proporción para cada ejecución para construir las distribuciones. En base a los resultados de estas simulaciones, se encontró que las distribuciones normales eran buenos modelos de disomía y trisomía.

La puntuación final del riesgo del algoritmo de cálculo del riesgo se define como:

$$\frac{P(x_j | T)P(T)}{P(x_j | D)P(D)}$$

20 donde $P(T)/P(D)$ es el riesgo previo de trisomía frente a disomía. Los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia se tomaron de tablas bien establecidas que capturaban el riesgo de trisomía asociado con la edad materna y gestacional del sujeto (Nicolaidis, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 21:313-321 (2003)).

25 Aunque esta invención se satisface con aspectos en muchas formas diferentes, como se describe en detalle en relación con aspectos preferentes de la invención, se entiende que la presente divulgación se debe considerar ejemplar de los principios de la invención y no pretende limitar la invención a los aspectos específicos ilustrados y descritos en el presente documento. El alcance de la invención se mide por las reivindicaciones adjuntas. El resumen y el título no se deben interpretar como limitantes del alcance de la presente invención, ya que su propósito es permitir que las autoridades apropiadas, así como el público en general, determinen rápidamente la naturaleza general de la invención.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento no invasivo para calcular el riesgo de aneuploidia fetal en una muestra materna,

5 comprendiendo el procedimiento una etapa de interrogar en una única reacción multiplexada (a) uno o más loci no polimórficos en la muestra materna en cada cromosoma para el cual se va a estimar la dosis cromosómica, y (b) uno o más loci polimórficos en la muestra materna;

10 comprendiendo además el procedimiento un proceso implementado por ordenador para calcular el riesgo de aneuploidia fetal en una muestra materna como un cociente de posibilidades que comprende:

estimar la dosis cromosómica para dos o más cromosomas fetales en la muestra materna usando la información obtenida de interrogar loci no polimórficos;

15 determinar una proporción de ácido nucleico fetal en la muestra materna usando la información obtenida de interrogar loci polimórficos;

proporcionar datos sobre el riesgo previo de aneuploidia para al menos un primer cromosoma fetal basado en características extrínsecas relacionadas con la edad materna y/o la edad gestacional;

20 calcular un valor de una probabilidad de que el primer cromosoma fetal sea aneuploide comparando la dosis cromosómica del primer cromosoma fetal con la dosis cromosómica de un segundo cromosoma fetal en vista de la proporción de ácido nucleico fetal en la muestra materna y el riesgo previo de aneuploidia;

25 calcular un valor de una probabilidad de que el primer cromosoma fetal sea disómico comparando la dosis cromosómica del primer cromosoma fetal con la dosis cromosómica del segundo cromosoma fetal en vista de la proporción de ácido nucleico fetal en la muestra materna y el riesgo previo de aneuploidia;

30 calcular un cociente de posibilidades del riesgo de aneuploidia fetal, que es un cociente de posibilidades del valor de la probabilidad de que el primer cromosoma sea aneuploide, y el valor de la probabilidad de que el primer cromosoma sea disómico.

35 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el riesgo de aneuploidia se calcula como un cociente de posibilidades que compara un modelo que supone un cromosoma fetal disómico y un modelo que supone un cromosoma fetal trisómico,

en el que la distribución de las diferencias en las proporciones observadas y de referencia se evalúa usando distribuciones normales con una media de 0 y una desviación estándar estimada usando simulaciones de Monte Carlo que se extraen aleatoriamente de los datos observados,

40 en el que, para el modelo disómico (*D*), se usa p_0 como la proporción de referencia prevista en las simulaciones,

en el que, para el modelo trisómico (*T*), p_0 se ajusta por muestra con la proporción de referencia ajustada por la proporción fetal \hat{p}_j definida como

45

$$\hat{p}_j = \frac{(1 + 0,5f_j)p_0}{((1 + 0,5f_j)p_0) + (1 - p_0)}$$

en el que f_j es la proporción fetal para la muestra *j*

50 en el que el algoritmo de cálculo del riesgo usado en el cálculo del riesgo estimado de aneuploidia como un cociente de posibilidades calcula

$$\frac{P(x_j | T)P(T)}{P(x_j | D)P(D)}$$

55 en el que $x_j = p_j - p_0$ se usa para describir la diferencia de la población observada p_j para la muestra *j* y la proporción de referencia estimada p_0 , y en el que $P(T)/P(D)$ es el riesgo previo de trisomía frente a disomía.

60 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra materna es una muestra materna extracelular.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra materna extracelular es plasma o suero materno.
- 5 5. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la muestra materna comprende células.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia comprende información relacionada con la edad materna.
- 10 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia comprende información relacionada con la edad gestacional.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia comprende información relacionada con embarazos previos con un feto aneuploide.
- 15 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los datos sobre el riesgo previo de aneuploidia comprende información relacionada con resultados de un prueba de detección en suero anteriores.
- 20 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la dosis cromosómica del primer y segundo cromosoma fetal se estima usando información obtenida interrogando al menos diez loci en cada cromosoma para el cual se está estimando la dosis cromosómica.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la dosis cromosómica del primer y segundo cromosoma fetal se estima usando la información obtenida interrogando al menos cuarenta y ocho loci en cada cromosoma para el cual se está estimando la dosis cromosómica.
- 30 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la dosis cromosómica del primer y segundo cromosoma fetal se estima usando la información obtenida interrogando al menos noventa y seis loci en cada cromosoma para el cual se está estimando la dosis cromosómica.
- 35 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el riesgo de aneuploidia fetal para el primer cromosoma fetal se basa en un valor de una probabilidad de que el cromosoma sea trisómico y un valor de la probabilidad de que el cromosoma sea disómico.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12, en el que el valor del riesgo de aneuploidia fetal para el primer cromosoma fetal se basa en un valor de una probabilidad de que el cromosoma sea monosómico y un valor de la probabilidad de que el cromosoma sea disómico.

10

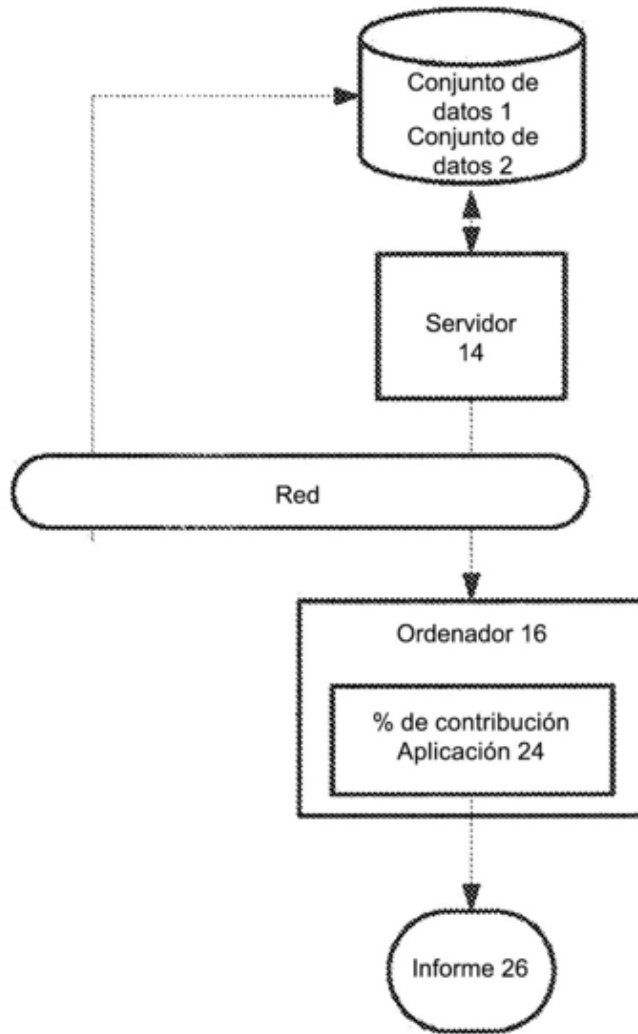


Figura 1

| Cohorte 3 | Estado | N.º de sujetos | Edad material (años) | | | Edad gestacional (semanas) | | |
|---------------|----------|----------------|----------------------|-----|-----|----------------------------|------|------|
| | | | Prom | Mín | Máx | Prom | Mín | Máx |
| Formación | Disómico | 127 | 34,4 | 18 | 44 | 17,1 | 10,3 | 32,4 |
| | T18 | 8 | 37,7 | 27 | 44 | 18,4 | 13,0 | 25,9 |
| | T21 | 36 | 34,2 | 18 | 44 | 18,9 | 11,0 | 33,0 |
| | Total | 171 | 34,5 | 18 | 44 | 17,6 | 10,3 | 33,0 |
| Validación | Disómico | 123 | 33,1 | 18 | 51 | 18,3 | 11,0 | 30,4 |
| | T18 | 8 | 36,6 | 25 | 43 | 15,7 | 11,7 | 21,0 |
| | T21 | 36 | 34,1 | 18 | 46 | 20,1 | 12,3 | 36,1 |
| | Total | 167 | 33,5 | 18 | 51 | 18,6 | 11,0 | 36,1 |
| Total general | | 338 | 34,0 | 18 | 51 | 127 | 18,1 | 10,3 |

Figura 2

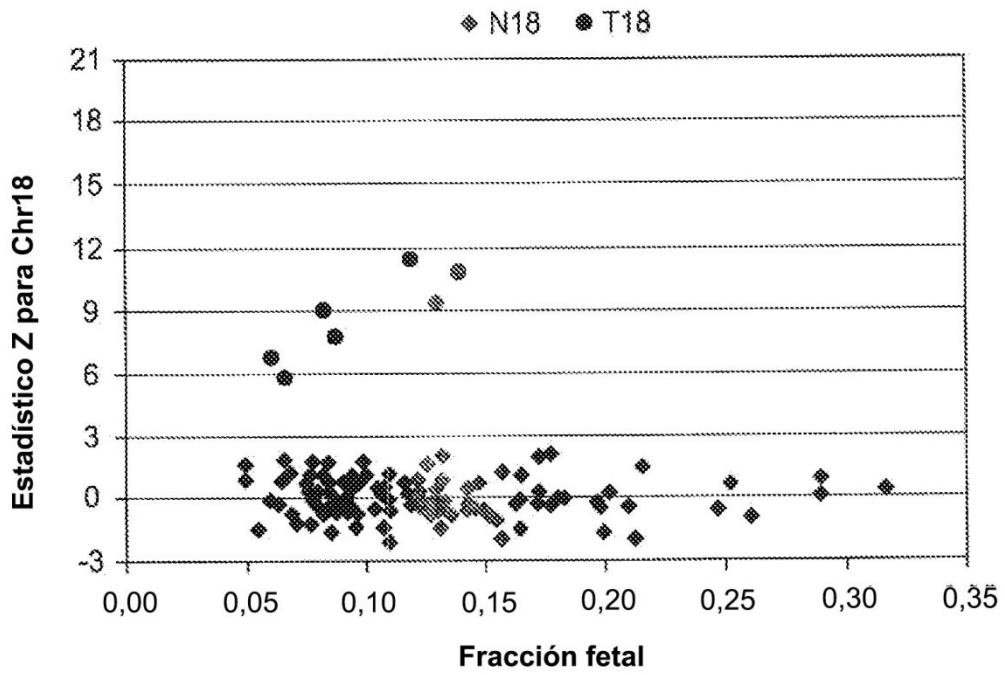


Figura 3A

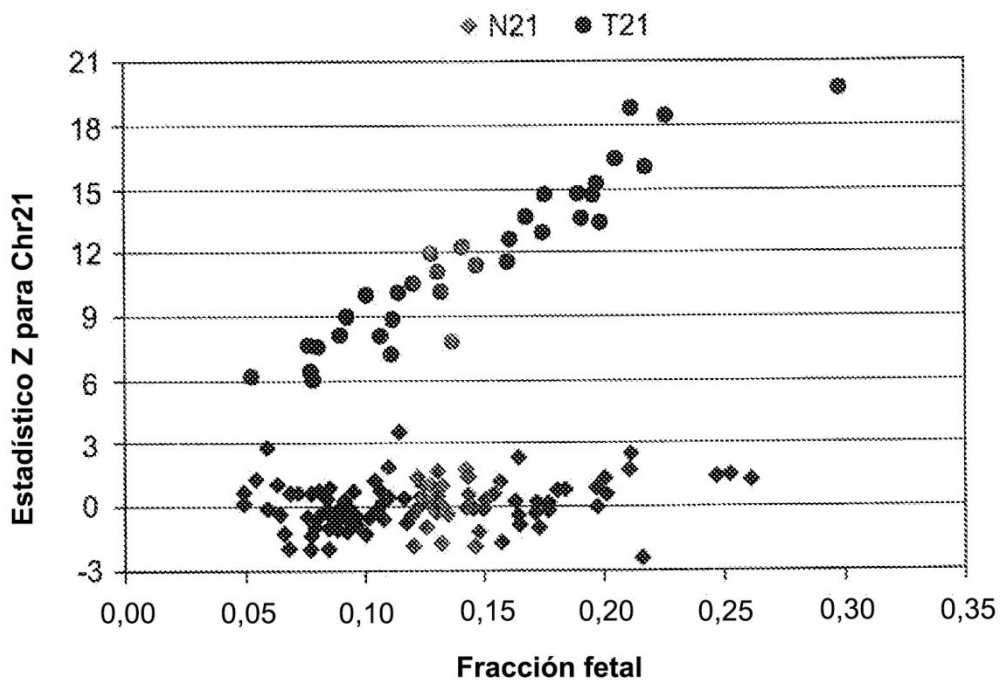


Figura 3B

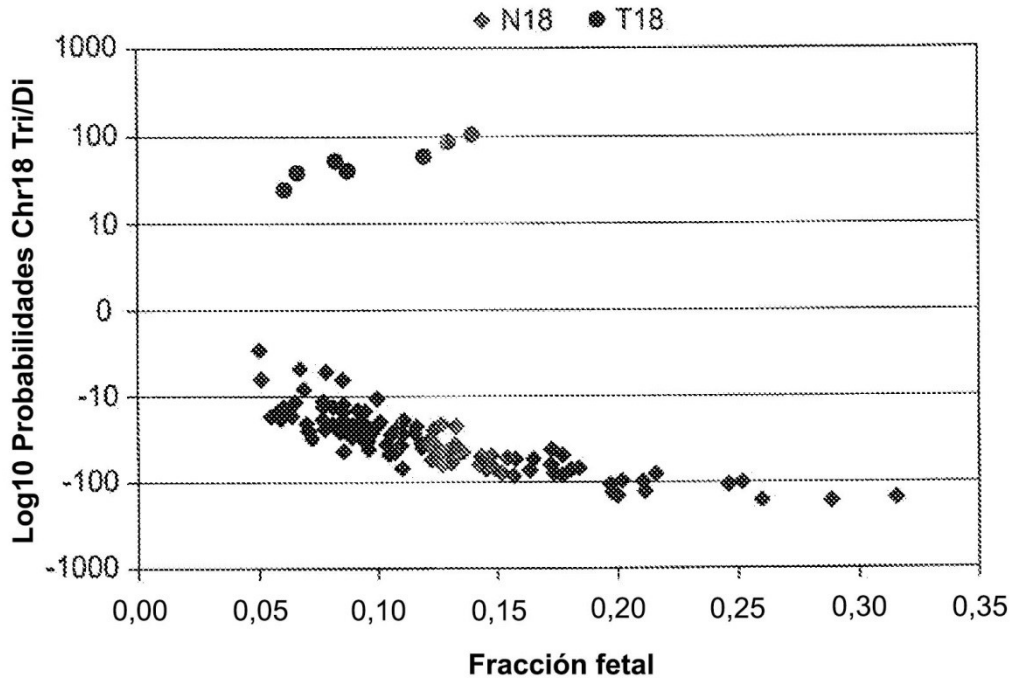


Figura 4A

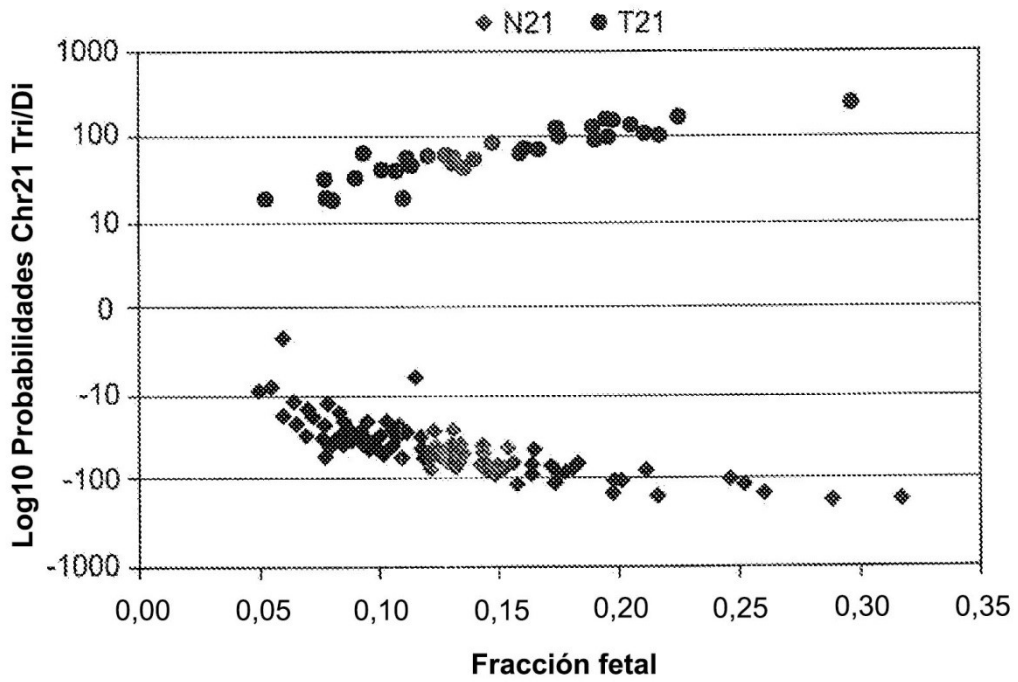


Figura 4B

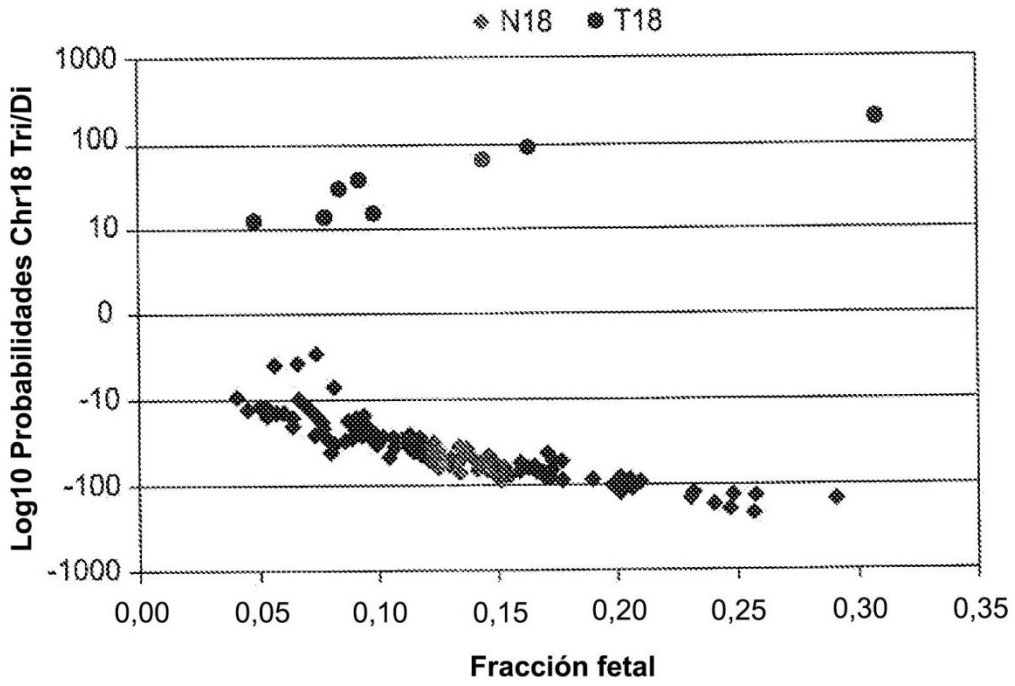


Figura 5A

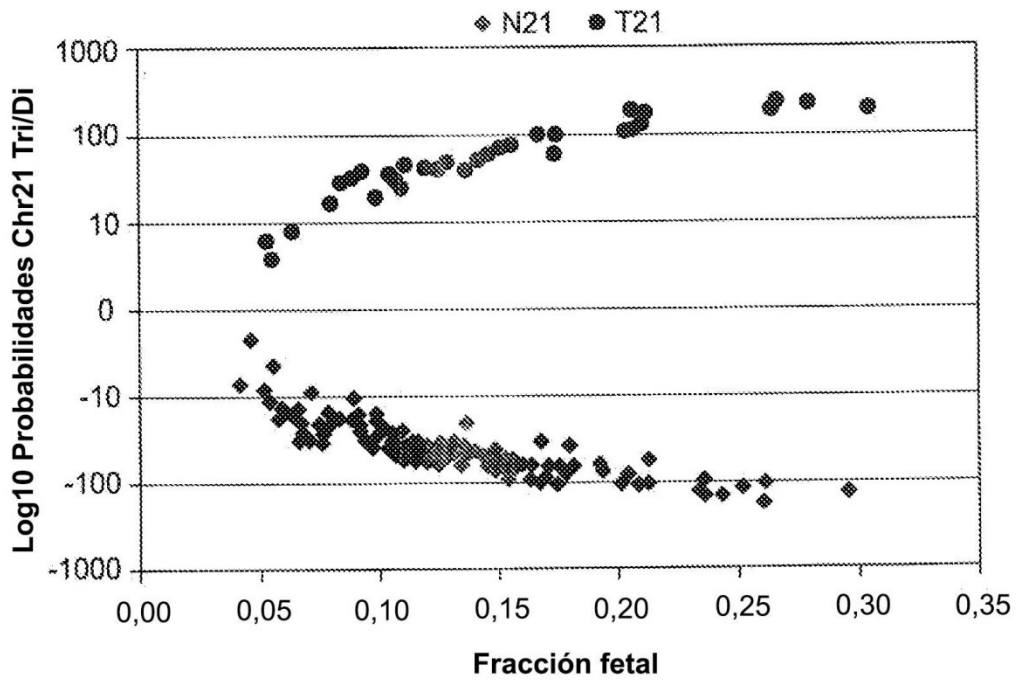


Figura 5B