

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 237**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6837** (2008.01)

**C12Q 1/6862** (2008.01)

**C12Q 1/6883** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2015 PCT/US2015/042604**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16018986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2015 E 15826681 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3175236**

54 Título: **Detección de ácidos nucleicos diana usando hibridación**

30 Prioridad:

**01.08.2014 US 201414450144**

**06.08.2014 US 201414453396**

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

**03.04.2020**

73 Titular/es:

**ARIOSIA DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)**  
**5945 Optical Court**  
**San Jose, CA 95138, US**

72 Inventor/es:

**OLIPHANT, ARNOLD;**  
**ZAHN, JACOB;**  
**JUNEAU, KARA;**  
**BOGARD, PATRICK y**  
**HUANG, STEPHANIE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 752 237 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Detección de ácidos nucleicos diana usando hibridación

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la detección de regiones genómicas diana a partir de muestras.

**10 Antecedentes de la invención**

10 En el siguiente análisis se describirán determinados artículos y procedimientos con propósitos preliminares e  
 introductorios. 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  
 procedimientos a los que se hace referencia en el presente documento no constituyen una técnica anterior conforme  
 15 a las disposiciones legales aplicables.

Las anomalías genéticas representan un amplio número de patologías, incluyendo las patologías provocadas por  
 aneuploidía cromosómica (por ejemplo, síndrome de Down), mutaciones hereditarias en genes específicos (por  
 ejemplo, anemia drepanocítica) y patologías provocadas por mutaciones somáticas (por ejemplo, cáncer). Los  
 20 procedimientos de diagnóstico para determinar anomalías genéticas se han convertido en técnicas estándar para  
 identificar enfermedades y trastornos específicos, así como para proporcionar información valiosa sobre la fuente de  
 la enfermedad y las opciones de tratamiento.

Las variaciones en el número de copias (CNV) son alteraciones de ADN genómico que corresponden a regiones  
 25 específicas del genoma (incluyendo cromosomas completos) que se han eliminado o duplicado. Las CNV se pueden  
 provocar por reordenamientos genómicos tales como deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Las  
 CNV se han asociado con diversas formas de cáncer (Cappuzzo F, Hirsch, *et al.* (2005) *J Natl Cancer Inst.*, 97(9):643-  
 55), trastornos neurológicos, incluyendo autismo (Sebat, J., *et al.* (2007) *Science* 316(5823):445-9) y esquizofrenia  
 (St. Clair, D., (2008). *Schizophr Bull* 35(1):9-12). Los documentos WO2012019193 A2, WO2013009175 A1 y  
 30 WO0056927 A2 describen procedimientos de ligación para evaluar la presencia de polimorfismos y variaciones en el  
 número de copias.

Por lo tanto, existe la necesidad de obtener procedimientos de cribado de variaciones en el número de copias que  
 35 empleen un sistema de ensayo y detección eficaz y reproducible.

**Sumario de la invención**

Este Sumario se proporciona para introducir una selección de conceptos de forma simplificada que se describen  
 40 además a continuación en la Descripción detallada. Otros rasgos, detalles, utilidades y ventajas de la materia objeto  
 reivindicada serán evidentes a partir de la siguiente Descripción detallada por escrito incluyendo los aspectos  
 ilustrados en los dibujos adjuntos y definidos en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona procedimientos para detectar características genéticas en una muestra, incluyendo  
 45 variaciones en el número de copias (CNV), inserciones, deleciones, translocaciones, polimorfismos y mutaciones,  
 como se establece en las reivindicaciones. La invención emplea la técnica de interrogar locus de dos o más regiones  
 genómicas diana usando al menos dos oligonucleótidos de secuencia fija para cada locus interrogado, y unir los  
 oligonucleótidos de secuencia fija directa o bien indirectamente por medio de ligación. Los productos de ligación de  
 diferentes locus en regiones genómicas seleccionadas comprenden regiones de captura de ácido nucleico diseñadas  
 50 para incluir una región complementaria a una o más sondas de captura en un soporte sólido. La región de captura  
 comprende uno o más marcadores detectables que identifican un producto de ligación como originario de una región  
 genómica diana específica. La identificación de productos de ligación de diferentes regiones genómicas diana se logra  
 por la unión de las regiones de captura de los productos de ligación a sondas de captura complementarias en el  
 soporte sólido.

55 En un caso específico, la invención proporciona un procedimiento de ensayo para proporcionar una verosimilitud  
 estadística de una aneuploidía fetal que comprende proporcionar una muestra materna que comprende ADN sin  
 células maternas y fetales, interrogar uno o más locus de una primera región genómica diana usando oligonucleótidos  
 específicos de secuencia que comprenden una región de captura, interrogar uno o más locus de una segunda región  
 genómica diana usando oligonucleótidos específicos de secuencia que comprenden una región de captura, detectar  
 60 los locus seleccionados aislados de las primera y segunda regiones genómicas diana por medio de hibridación a una  
 matriz, cuantificar los recuentos totales de los locus aislados para determinar una frecuencia relativa de las primera y  
 segunda regiones genómicas diana, interrogar los locus polimórficos seleccionados de al menos una región genómica  
 diana diferente de las primera y segunda regiones genómicas diana usando oligonucleótidos específicos de secuencia,  
 65 detectar los locus polimórficos seleccionados aislados, cuantificar los recuentos totales de los locus polimórficos  
 seleccionados aislados para calcular un porcentaje del ADN sin células fetales en la muestra materna, calcular una  
 verosimilitud estadística de una aneuploidía fetal en la muestra materna, en el que la frecuencia relativa de los locus

de la primera región genómica diana, la frecuencia relativa de los locus de la segunda región genómica diana, y los recuentos cuantificados de los locus polimórficos seleccionados aislados proporcionan una verosimilitud estadística de la presencia de una aneuploidía fetal.

5 En otros casos específicos, la invención proporciona un procedimiento de ensayo que determina la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal que comprende proporcionar una muestra materna que comprende ADN sin células maternas y fetales, interrogar uno o más locus de una primera región genómica diana usando oligonucleótidos específicos de secuencia que comprenden una región de captura, interrogar uno o más locus de una segunda región genómica diana usando oligonucleótidos específicos de secuencia que comprenden una región de captura, detectar  
10 los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana por medio de hibridación a una matriz, cuantificar los recuentos totales de los locus para determinar una frecuencia relativa de las primera y segunda regiones genómicas diana, y determinar la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal en la muestra materna en base a una desviación de los recuentos esperados de los locus aislados usando la frecuencia relativa de los locus de la primera región genómica diana y la frecuencia relativa de los locus de la segunda región genómica diana. En determinados aspectos,  
15 la desviación de los recuentos esperados se determina usando un nivel umbral determinado a partir de una población representativa de muestras, y preferentemente una población representativa que comprende muestras de pacientes de edad materna y/o edad gestacional similar.

20 En aspectos específicos, la interrogación de los locus de las primera y segunda regiones genómicas usa hibridación seguido de ligación. En aspectos más específicos, se realiza una etapa de amplificación después de las etapas de hibridación y ligación. En otros aspectos específicos, la amplificación es amplificación universal usando la reacción en cadena de la polimerasa.

25 En aspectos preferentes, los productos de ligación de dos o más regiones genómicas diferentes se identifican usando un único soporte sólido con sondas de captura; por ejemplo, una matriz que comprende sondas de captura complementarias a múltiples regiones de captura indicativas de las diferentes regiones genómicas diana. Tras introducir una reserva de productos de ligación que se originan en dos o más regiones genómicas diferentes a la matriz, los productos de ligación que tienen la misma región de captura se hibridarán competitivamente con sondas de captura complementarias en la matriz, y la frecuencia relativa de los productos de ligación de cada región genómica se puede estimar en base a la cantidad de marcador detectado unido a las sondas de captura. De esta manera, se  
30 pueden determinar las frecuencias relativas de las propias regiones genómicas diana. Las frecuencias relativas de cada región genómica diana se pueden determinar identificando la unión de las regiones de captura en los productos de ligación correspondientes a cada locus seleccionado de cada región genómica diana a localizaciones conocidas específicas en la matriz, o estimando la fluorescencia total de la matriz después de la unión de los productos de ligación que se originan en las regiones genómicas diana.  
35

40 En determinados modos de realización preferentes, las regiones de captura y las sondas de captura no reflejan la secuencia de nucleótidos de la región genómica diana específica, y en su lugar son secuencias "genomanipuladas" que sirven como sustitutas para identificar regiones genómicas diana específicas; por tanto, la secuencia de nucleótidos del producto de ligación correspondiente a la región genómica diana no necesita determinarse directamente. El uso de las regiones de captura en los productos de ligación permite la unión de los productos de ligación a las sondas de captura en la matriz para indicar la región genómica diana más grande a partir de la que se origina el producto de ligación sin la necesidad de secuenciar la porción del producto de ligación correspondiente a la secuencia de nucleótidos real de la región genómica diana. Debido a que las regiones de captura y las sondas de  
45 captura son secuencias genomanipuladas, se pueden considerar secuencias "universales"; es decir, estas regiones de captura y sondas de captura se pueden usar junto con cualquier número de ensayos diferentes, siendo la única diferencia la(s) secuencia(s) diana asociada(s) con la(s) región/regiones de captura.

50 En un modo de realización, las matrices comprenden sondas de captura que tienen todas sustancialmente la misma secuencia. En otro modo de realización, las matrices usadas comprenden de dos a varias casillas diferentes con sondas de captura que tienen sustancialmente la misma secuencia. Estas matrices están en contraste con las matrices conocidas en la técnica que identifican secuencias individuales por complementariedad con casillas individuales comprendiendo cada casilla una secuencia del ácido nucleico diferente de las otras casillas. El uso de una única o de un número limitado de secuencias de sondas de captura complementarias en las casillas individuales en una matriz  
55 puede simplificar la bioquímica necesaria para crear la matriz y reducir las falsas diferencias potenciales en la detección de la frecuencia que resultan, por ejemplo, de las diferencias en la afinidad de unión entre las regiones de captura en los productos de ligación y las sondas de captura.

60 En modos de realización específicos, las matrices comprenden dos o más sondas de captura diferentes usadas para detectar productos de ligación individuales de dos o más regiones genómicas diana diferentes, dos o más locus diferentes de una única región genómica diana, o dos o más alelos diferentes de un locus seleccionado. Es decir, las sondas de captura de secuencia diferente se hibridan a regiones de captura en productos de ligación que corresponden a regiones genómicas diana diferentes, locus diferentes de una única región genómica diana o alelos diferentes de un locus seleccionado. Las regiones de captura en los productos de ligación se asocian con marcadores  
65 indicativos de la región genómica diana o locus seleccionado, o indicativos de los alelos de un polimorfismo, del que se origina el producto de ligación.

5 Por tanto, es un modo de realización preferente de la invención que los productos de ligación se identifiquen usando una sonda de captura que es complementaria a una región de captura introducida en o al producto de ligación, pero que no identifica la región genómica diana a la que corresponde el producto de ligación únicamente por hibridación a una casilla complementaria a la región genómica diana. En algunos modos de realización, la sonda de captura es en parte complementaria a una región genómica diana y en parte complementaria a una región de captura en un producto de ligación. En un modo de realización preferente, la región de captura usada para identificar un producto de ligación que corresponde a una región genómica diana no es complementaria a ninguna porción de la región genómica diana.

10 En la invención, la región de captura se introduce como parte de uno de los oligonucleótidos de secuencia fija antes de la ligación. En la presente divulgación, la región de captura se puede unir (por ejemplo, por medio de ligación de un adaptador) a uno o ambos extremos del producto de ligación de los oligonucleótidos de secuencia fija después del procedimiento de ligación.

15 Otro rasgo del formato de ensayo de hibridación de la invención es que la cuantificación de regiones genómicas diana cuando se usan regiones de captura se puede lograr cuantificando los marcadores que se asocian con los productos de ligación de los locus dentro de la región genómica diana sin determinar realmente la secuencia de los productos de ligación correspondientes a las regiones genómicas diana. De esta manera, la frecuencia de los productos de ligación de una región genómica diana (y, por tanto, la frecuencia de las propias regiones genómicas diana) se puede

20 estimar sin la necesidad de detectar la secuencia de nucleótidos real de los locus de esa región genómica diana.

En muchos modos de realización preferentes, la cuantificación de los marcadores unidos a las sondas de captura en la matriz es la única lectura necesaria para estimar los niveles o cantidades de productos de ligación producidos a partir de cada región genómica diana, que a su vez se puede usar para estimar la frecuencia de las regiones

25 genómicas diana.

Una ventaja de los procedimientos de la invención es que los productos de ligación se pueden asociar con múltiples diferentes marcadores detectables y/o regiones de captura. El uso de diferentes marcadores y/o regiones de captura en diferentes experimentos puede mitigar cualquier sesgo de frecuencia del uso de un marcador detectable, región

30 de captura o sonda de captura particular.

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar frecuencias de las primera y segunda regiones genómicas diana en una muestra que comprenden: introducir un primer conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en una muestra en condiciones que permiten que los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia

35 fija se hibriden específicamente a regiones complementarias en locus de una primera región genómica diana, en la que al menos uno del primer o segundo oligonucleótido de secuencia fija del primer conjunto comprende una región de captura y un primer marcador; introducir un segundo conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en una muestra en condiciones que permiten que los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden específicamente a regiones complementarias en locus de una segunda región genómica diana, en la que al

40 menos uno del primer o segundo oligonucleótido de secuencia fija del segundo conjunto comprende una región de captura y un segundo marcador; ligar los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados para crear productos de ligación complementarios a los locus; introducir los productos de ligación en una matriz que comprende sondas de captura en condiciones que permiten que las sondas de captura en la matriz se hibriden específicamente a las regiones de captura de los productos de ligación; detectar los primer y segundo marcadores; y cuantificar una frecuencia relativa de los

45 primer y segundo marcadores para cuantificar la frecuencia relativa de las primera y segunda regiones genómicas diana. En algunos aspectos, las regiones de captura de los primer y segundo conjuntos de productos de ligación son diferentes. En otros aspectos, las regiones de captura de los primer y segundo conjuntos de productos de ligación son iguales.

50 En un aspecto preferente, las primera y segunda regiones de captura de los primer y segundo conjuntos de oligonucleótidos son iguales. En otros aspectos, se usa un pequeño número de regiones de captura en los oligonucleótidos de secuencia fija tanto del primer como del segundo conjunto. En otros aspectos, las primeras regiones de captura correspondientes a la primera región genómica diana son diferentes de las segundas regiones de captura correspondientes a la segunda región genómica.

55 En otros modos de realización preferentes, además de interrogar las primera y segunda regiones genómicas diana, también se interrogan las secuencias polimórficas que comprenden SNP de dos o más locus polimórficos seleccionados. Los locus polimórficos seleccionados se interrogan usando un tercer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija para determinar frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas se usan, por ejemplo, para calcular el

60 porcentaje de ácidos nucleicos fetales presentes en una muestra de suero materno.

En determinados modos de realización, los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija no se hibridan de forma adyacente a los locus en las regiones genómicas diana, y en su lugar tienen una región intermedia o "hueco" entre los oligonucleótidos de secuencia fija de un conjunto hibridado a un locus. Esta región intermedia se puede

65 llenar, por ejemplo, usando una polimerasa y dNTP para extender el extremo de un oligonucleótido de secuencia fija de modo que el extremo se vuelva adyacente al extremo del otro oligonucleótido hibridado del conjunto. En otro modo

de realización, la región intermedia se puede llenar usando uno o más oligonucleótidos de "relleno de hueco" o "puente" que se unen entre y adyacentes a los oligonucleótidos de secuencia fija de un conjunto. En el último caso, preferentemente la etapa de ligación ligará todos los oligonucleótidos en un único producto de ligación contiguo que comprende una única región de captura que a continuación se puede detectar en una matriz. Aún en otro modo de realización, se puede usar una combinación de oligonucleótidos puente y dNTP y polimerasa para llenar el espacio intermedio entre los oligonucleótidos de secuencia fija.

En los modos de realización descritos anteriormente, se usa un conjunto de ácidos nucleicos de secuencia fija que comprende dos oligonucleótidos de secuencia fija separados diseñados para hibridarse a dos regiones separadas en cada locus seleccionado (de forma adyacente o bien no adyacente). En algunos casos, sin embargo, un conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija puede comprender una única sonda con regiones en cada extremo complementarias a un locus seleccionado. Tras la hibridación de esta única sonda a un locus, la sonda forma una estructura circular que se puede hibridar o no de forma adyacente en el locus. Dichas sondas "precirculares" también se pueden hibridar con un hueco entre los extremos de la sonda, hueco que se puede llenar por la hibridación de uno o más oligonucleótidos puente, por extensión de un extremo de la sonda usando polimerasa y dNTP, o una combinación de los mismos.

En determinados aspectos, los marcadores detectables se asocian directamente con (es decir, se unen de forma covalente o no covalente a) una región de captura que está en uno de los oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto. En otro modo de realización, los productos de ligación se amplifican después de la ligación, por ejemplo, en una amplificación universal, y el marcador detectable se asocia con una región de captura contenida dentro de un cebador usado para la amplificación. En otros aspectos específicos, los locus aislados de las primera y segunda regiones genómicas diana y los productos de ligación de los locus polimórficos seleccionados se amplifican en un único recipiente. En otros aspectos, los marcadores detectables se unen de forma covalente o no covalente a un oligonucleótido que se hibrida a una secuencia complementaria en los productos de ligación, amplicones o productos de escisión de los mismos. Dichos oligonucleótidos marcados se pueden hibridar a los productos de ligación antes de o después de la introducción de los productos de ligación en la matriz de sonda de captura.

En otros modos de realización de la invención, las regiones de captura en los productos de ligación correspondientes a diferentes regiones genómicas diana comprenden diferentes secuencias, y la frecuencia comparativa de al menos una primera y una segunda región genómica diana se determinan en base al uso de diferentes marcadores detectables asociados con las diferentes regiones de captura.

En determinados aspectos, las variantes del número de copias se detectan por una alteración de una proporción esperada de marcador detectable unido de los productos de ligación unidos de las regiones genómicas diana en la muestra. En determinados aspectos específicos, las variantes del número de copias se detectan por un incremento o una disminución en el nivel de hibridación de un primer conjunto de productos de ligación de un primer locus seleccionado en comparación con un segundo conjunto de productos de ligación de un segundo locus seleccionado.

La frecuencia relativa de los locus en una muestra se puede usar para determinar no solo la variación en el número de copias para una región genómica diana pequeña, sino también junto con y/o en comparación con otros locus, la frecuencia relativa de los locus se puede usar para determinar el variación en el número de copias de regiones genómicas diana más grandes, incluyendo cromosomas parciales o completos.

En otro aspecto general de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar frecuencias de primera y segunda regiones genómicas diana en una muestra que comprende introducir un primer conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en una muestra en condiciones que permiten que los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden específicamente a regiones complementarias en locus en la primera región genómica diana para crear primeros oligonucleótidos de secuencia fija hibridados; introducir un segundo conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en la muestra en condiciones que permiten que los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden específicamente a regiones complementarias para crear segundos oligonucleótidos de secuencia fija hibridados; y ligar los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados de cada conjunto para crear productos de ligación complementarios a los locus en las primera y segunda regiones genómicas diana. Al menos un oligonucleótido de secuencia fija de cada conjunto comprende una región de captura que comprende una secuencia complementaria a las sondas de captura en una matriz y una región de unión para un marcador detectable. Los productos de ligación se introducen en la matriz que comprende sondas de captura complementarias a las regiones de captura de los productos de ligación en condiciones que permiten que las sondas de captura se hibriden específicamente a las regiones de captura de los productos de ligación. Se introduce un primer marcador detectable en la matriz en condiciones que permiten que el marcador detectable se hibride específicamente a la región de unión de la región de captura en los productos de ligación de los locus de la primera región genómica diana, y se introduce un segundo marcador detectable en la matriz en condiciones que permiten que el marcador detectable se hibride específicamente a las regiones de unión de la región de captura en los productos de ligación de los locus de la segunda región genómica diana. Los primer y segundo marcadores detectables se detectan y se cuantifican para proporcionar una frecuencia relativa de las primera y segunda regiones genómicas diana en la muestra. Como se analiza anteriormente, en relación con un modo de realización, además de interrogar las primera y segunda regiones genómicas diana, los aspectos de este modo de realización interrogan secuencias polimórficas que

comprenden SNP de dos o más locus polimórficos seleccionados. Los locus polimórficos seleccionados se interrogan usando un tercer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija para determinar frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas se usan, por ejemplo, para calcular el porcentaje de ácidos nucleicos fetales presentes en una muestra de suero materno. También como se analiza anteriormente, en algunos aspectos de este modo de realización, se pueden emplear oligonucleótidos de "relleno de hueco" o "puente" además de los dos oligonucleótidos de secuencia fija, y en algunos aspectos de este modo de realización, los oligonucleótidos de secuencia fija o los oligonucleótidos puente son específicos de alelo, como se describe en detalle más adelante.

En casos específicos, el ensayo de la divulgación proporciona identificar alelos de baja frecuencia de los locus polimórficos seleccionados aislados donde el ADN materno es homocigótico y el ADN no materno es heterocigótico, computar una suma de alelos de baja frecuencia de los locus polimórficos seleccionados aislados, y calcular una verosimilitud estadística de una aneuploidía fetal en la muestra materna usando la suma de los alelos de baja frecuencia de los locus polimórficos seleccionados aislados para calcular diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de la región genómica diana para las primera y segunda regiones genómicas diana, y en el que una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia cromosómica proporciona una verosimilitud estadística de la presencia de una aneuploidía fetal.

Aún en otro aspecto general de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar frecuencias de primera y segunda regiones genómicas diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento proporcionar una muestra; introducir un primer conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en la muestra en condiciones que permiten que los oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden específicamente a regiones complementarias en los primeros locus de la primera región genómica diana para crear los primeros oligonucleótidos de secuencia fija hibridados; e introducir un segundo conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en la muestra en condiciones que permiten que los oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden específicamente a regiones complementarias en los segundos locus de la segunda región genómica diana para crear segundos oligonucleótidos de secuencia fija hibridados. Al menos uno de los oligonucleótidos de secuencia fija del primer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija comprende una región de captura y una región de unión a marcador complementaria a un primer marcador detectable, y al menos uno de los oligonucleótidos de secuencia fija del segundo conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija comprende sustancialmente la misma región de captura que el primer conjunto y una región de unión a marcador complementaria a un segundo marcador detectable. Los oligonucleótidos de secuencia fija del primer y segundo conjunto se ligan para crear los primer y segundo productos de ligación que comprenden regiones complementarias a los primer y segundo locus, respectivamente, y se marcan con un primer y segundo marcador detectable. Los primer y segundo productos de ligación se introducen en una matriz que comprende sondas de captura en condiciones que permiten que las sondas de captura se hibriden específicamente a las regiones de captura de los productos de ligación. Los primer y segundo marcadores se detectan y se cuantifican para determinar una frecuencia relativa de los primer y segundo marcadores, cuantificando de este modo una frecuencia relativa de las primera y segunda regiones genómicas diana en la muestra.

Los marcadores detectables se pueden introducir en los productos de ligación antes de la introducción de los productos de ligación en la matriz. De forma alternativa, los marcadores detectables se pueden introducir en la matriz después de la hibridación de los productos de ligación.

De nuevo, en determinados modos de realización, los procedimientos emplean además la extensión de al menos un oligonucleótido de secuencia fija hibridado a una secuencia de interés. Es decir, en algunos modos de realización, los oligonucleótidos de secuencia fija que se hibridan a uno o más locus puede que no se hibriden de forma adyacente, dejando un "hueco" o región "intermedia". Esta región intermedia se puede llenar, por ejemplo, usando una polimerasa y dNTP para extender el extremo de un oligonucleótido de secuencia fija de modo que el extremo sea adyacente al extremo del otro oligonucleótido de secuencia fija hibridado del conjunto. En otro modo de realización, la región intermedia se puede llenar usando uno o más oligonucleótidos de "relleno de hueco" o "puente" que se unen entre y adyacentes a los oligonucleótidos de secuencia fija de un conjunto. En el último caso, preferentemente la etapa de ligación ligará todos los oligonucleótidos en un único producto de ligación contiguo que comprende una única región de captura que a continuación se puede detectar en una matriz. También, se puede usar una combinación de oligonucleótidos puente o de relleno de hueco y dNTP y polimerasa para llenar el hueco. Adicionalmente en algunos modos de realización, se pueden usar sondas precirculares, candado ("*padlock*") o de inversión molecular en lugar de dos oligonucleótidos de secuencia fija en un conjunto.

Cuando se usan oligonucleótidos de relleno de hueco o puente, los oligonucleótidos puente son típicamente cortos, preferentemente de entre 2-30 nucleótidos y más preferentemente de entre 3-28 nucleótidos de longitud. En un aspecto, los oligonucleótidos puente se pueden diseñar para proporcionar redundancia en múltiples o todas las posiciones, por ejemplo, los oligonucleótidos puente pueden ser total o parcialmente aleatorios con diversas variaciones de secuencia para garantizar la detección de los locus incluso si un locus contiene un nucleótido polimórfico en una o más posiciones. La redundancia del oligonucleótido puente se puede diseñar en base a los polimorfismos predichos que pueden estar presentes en los locus. De forma alternativa, en otro aspecto, la reserva de oligonucleótidos puente usados en una reacción puede proporcionar una redundancia limitada dirigida específicamente a una o más posiciones en base a polimorfismos predichos que pueden estar presentes en las regiones de los locus. Aún en otro aspecto, la reserva de oligonucleótidos puente usados en una reacción puede

proporcionar redundancia para cada posición interna, permaneciendo fijos los nucleótidos adyacentes a los sitios de ligación con los oligonucleótidos de secuencia fija. Es una ventaja que el uso de oligonucleótidos puente redundantes evita la necesidad de predeterminedar el contenido polimórfico materno y fetal para un locus seleccionado antes de emplear los procedimientos de detección de la presente invención.

5 En otro aspecto, el oligonucleótido puente tiene más de 10 nucleótidos de longitud y preferentemente tiene 18-30 nucleótidos de longitud. En un aspecto preferente, existe un único oligonucleótido puente complementario a cada locus seleccionado diseñado para hibridarse entre las regiones del locus seleccionado complementario a los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija. En otro aspecto, se diseñan dos o más oligonucleótidos puente para hibridarse entre los oligonucleótidos de secuencia fija en cada locus seleccionado, y preferentemente los oligonucleótidos puente se hibridan de forma adyacente a los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija.

15 En la situación donde existen dos oligonucleótidos puente, se producen tres acontecimientos de ligación por locus seleccionado: ligación entre el primer oligonucleótido fijo y el primer oligonucleótido puente, ligación entre los primer y segundo oligonucleótidos puente y ligación entre el segundo oligonucleótido puente y el segundo oligonucleótido de secuencia fija. En otro aspecto, pueden existir huecos entre los oligonucleótidos puente y/o entre los oligonucleótidos puente y los oligonucleótidos de secuencia fija. Estos huecos se pueden llenar por extensión (por ejemplo, por el uso de polimerasa y dNTP) antes de la ligación.

20 En un aspecto de la invención, los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija se introducen en la muestra y se hibridan específicamente a las porciones complementarias de los locus antes de introducir los oligonucleótidos puente en la muestra. En otro aspecto, los oligonucleótidos puente se introducen en la muestra al mismo tiempo que los primer y segundo conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija se introducen en la muestra.

25 En otro aspecto general de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar una presencia o ausencia de una aneuploidía en una muestra mixta, comprendiendo el procedimiento proporcionar una muestra mixta; introducir un primer conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en la muestra mixta en condiciones que permiten que los oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden específicamente a los primeros locus en un primer cromosoma para crear primeros oligonucleótidos de secuencia fija hibridados, donde el primer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija comprende una primera región de captura y una primera región de unión a marcador; introducir un segundo conjunto de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija en la muestra mixta en condiciones que permiten que los oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden específicamente a los segundos locus en un segundo cromosoma para crear los segundos oligonucleótidos de secuencia fija hibridados, donde el segundo conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija comprende una segunda región de captura y una segunda región de unión a marcador; ligar los oligonucleótidos hibridados para crear productos de ligación complementarios a los locus; introducir los productos de ligación en una matriz que comprende sondas de captura en condiciones que permiten que las sondas de captura se hibriden específicamente a las primera y segunda regiones de captura de los productos de ligación; introducir un primer oligonucleótido marcado en la matriz en condiciones que permiten que una región de reconocimiento diana del primer oligonucleótido marcado se hibride específicamente a la primera región de unión a marcador; introducir un segundo oligonucleótido marcado en la matriz en condiciones que permiten que una región de reconocimiento diana del segundo oligonucleótido marcado se hibride específicamente a la segunda región de unión a marcador; detectar los primer y segundo marcadores; cuantificar frecuencias relativas de los primer y segundo marcadores, cuantificando de este modo una frecuencia relativa del primer y segundo cromosoma (o región genómica) en la muestra mixta, en el que una diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias relativas de los marcadores en la matriz es indicativa de la presencia o ausencia de una aneuploidía cromosómica en la muestra mixta.

50 En modos de realización alternativos, se puede usar un nivel "umbral" para determinar la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal en base a la desviación observada de la frecuencia relativa del primer y segundo cromosoma en la muestra mixta. Se puede determinar este valor umbral, por ejemplo, usando técnicas tales como las divulgadas en las solicitudes de EE. UU. 2012/0149583, 2013/0324420, 2013/0029852 y la patente de EE. UU. n.º 8.532.936. En determinados aspectos, la desviación de los recuentos esperados se determina usando un nivel umbral determinado a partir de una población representativa de muestras, y preferentemente una población representativa que comprende muestras de pacientes de características similares, tales como perfil de riesgo previo, edad materna y/o edad gestacional.

60 En aspectos preferentes de la invención, el ADN de muestra se une a un soporte sólido, antes, durante o bien después de la adición de los oligonucleótidos de secuencia fija. En aspectos preferentes de la invención, los ensayos emplean etapas para retirar oligonucleótidos no hibridados antes de la creación de productos de ligación, por ejemplo, por lavado o por digestión con exonucleasas. En otros aspectos preferentes, los productos de ligación se aíslan después de la ligación pero antes de un procesamiento adicional y/o introducción en la matriz para la detección. En otros modos de realización preferentes, los productos de ligación se amplifican, preferentemente usando cebadores universales, para formar amplicones. En otros modos de realización preferentes, los amplicones se escinden posteriormente para formar amplicones escindidos antes de la hibridación a una matriz. En modos de realización que implican la escisión de los productos de ligación, la región escindida que comprende las regiones de captura se separa preferentemente del resto de los productos de escisión antes de la introducción de la porción de la región de captura en la matriz.

En determinados aspectos, el ADN de muestra, los productos de ligación y/o los productos de amplificación se aíslan usando técnicas convencionales en la técnica. Por ejemplo, los complejos de hibridación (por ejemplo, los oligonucleótidos de secuencia fija unidos a los locus diana), los productos de ligación y/o los productos de amplificación se pueden aislar por unión a un sustrato sólido seguido de una etapa de separación, por ejemplo, lavado o digestión con nucleasas. En ejemplos específicos, se pueden aislar usando la unión a perlas magnéticas. En otros ejemplos específicos, se pueden aislar usando la unión a un sustrato con un compañero de unión, por ejemplo, el oligonucleótido se biotinila y el sustrato comprende avidina o estreptavidina. En los aspectos en los que se usan sondas precirculares, los complejos de hibridación y/o los productos de ligación se pueden aislar por la destrucción con nucleasas de sondas no circulares.

En algunos aspectos de este modo de realización, las primera y segunda regiones de captura tienen la misma secuencia de nucleótidos. En otros aspectos de este modo de realización, las primera y segunda regiones de captura tienen diferentes secuencias de nucleótidos. También como se analiza anteriormente, en relación con otros modos de realización, además de interrogar las primera y segunda regiones genómicas diana, los aspectos de este modo de realización interrogan secuencias polimórficas que comprenden SNP de dos o más locus polimórficos seleccionados. Los locus polimórficos seleccionados se interrogan, por ejemplo, usando un tercer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija para determinar las frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas se usan, por ejemplo, para calcular el porcentaje de ácidos nucleicos fetales presentes en una muestra de suero materno.

Como se analiza anteriormente, en algunos aspectos de este modo de realización, se pueden emplear la ligación de extensión y/o los oligonucleótidos "puente" además de los dos oligonucleótidos de secuencia fija. En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento para determinar una verosimilitud de una aneuploidía fetal que comprende las etapas de proporcionar una muestra materna que comprende ADN sin células maternas y fetales, introducir primeros conjuntos de dos oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a los locus en una primera región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a los locus, en el que al menos uno de los dos oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal y una región de captura, introducir segundos conjuntos de dos oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a los locus en una segunda región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a los locus, en el que al menos uno de los dos oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal y una región de captura, introducir terceros conjuntos de dos oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a un conjunto de locus polimórficos en una región genómica diana que es diferente de la primera región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a locus polimórficos seleccionados, en el que al menos uno de los dos oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal y una región de captura, introducir oligonucleótidos puente en la muestra materna en condiciones que permiten que los oligonucleótidos puente se hibriden específicamente a regiones complementarias en los locus entre los oligonucleótidos de secuencia fija, ligar los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija hibridados y los oligonucleótidos puente para crear productos de ligación complementarios a los locus, aislar los productos de ligación, amplificar los productos de ligación aislados usando los sitios de cebadores universales, aplicar los productos de ligación amplificados a una matriz, en el que la matriz comprende sondas de captura complementarias a las regiones de captura en los productos de ligación, cuantificar una frecuencia relativa de cada alelo de los locus polimórficos seleccionados para determinar un porcentaje de ADN sin células fetales en la muestra, cuantificar una frecuencia relativa de los locus de la primera región genómica diana y una frecuencia relativa de los locus de la segunda región genómica diana, y computar una verosimilitud de la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal usando la frecuencia relativa de los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana y el porcentaje de ADN sin células fetales para determinar la verosimilitud de la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal.

La invención también proporciona un procedimiento para determinar una verosimilitud de una aneuploidía fetal que comprende las etapas de proporcionar una muestra materna que comprende ADN sin células maternas y fetales, introducir primeros conjuntos de dos oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a los locus en una primera región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a los locus, en el que al menos uno de los dos oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal y una región de captura, introducir segundos conjuntos de dos oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a los locus en una segunda región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a los locus, en el que al menos uno de los dos oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal y una región de captura, introducir terceros conjuntos de dos oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a un conjunto de locus polimórficos en una región genómica diana que es diferente de la primera región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a los locus polimórficos seleccionados, en el que al menos uno de los dos oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal y una región de captura, extender al menos uno de los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados usando dNTP y una polimerasa para crear

oligonucleótidos hibridados de forma adyacente, ligar los oligonucleótidos hibridados de forma adyacente para crear los productos de ligación complementarios a los locus, aislar los productos de ligación, amplificar los productos de ligación aislados usando los sitios de cebadores universales, aplicar los productos de ligación amplificados a una matriz, en el que la matriz comprende sondas de captura complementarias a las regiones de captura en los productos de ligación, cuantificar una frecuencia relativa de cada alelo de los locus polimórficos seleccionados para determinar un porcentaje de ADN sin células fetales en la muestra, cuantificar una frecuencia relativa de los locus de la primera región genómica diana y una frecuencia relativa de los locus de la segunda región genómica diana, y computar una verosimilitud de la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal usando la frecuencia relativa de los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana y el porcentaje de ADN sin células fetales para determinar la verosimilitud de la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal.

En determinados aspectos, la invención comprende además comparar la frecuencia relativa de los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana y ajustar la frecuencia relativa de los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana en base al porcentaje de ADN sin células fetales para determinar la verosimilitud de la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal. En aspectos específicos, se suman las frecuencias relativas de cada locus seleccionado para cada región genómica diana y se comparan las sumas para cada cromosoma para calcular una proporción de región genómica diana.

El porcentaje de ADN sin células fetales de una muestra se puede calcular detectando los niveles de uno o más locus de aporte no materno, por ejemplo, los locus no maternos en el cromosoma Y y/o los locus no maternos son locus autosómicos. En aspectos preferentes, los locus no maternos comprenden una o más variaciones genéticas en comparación con los locus maternos, por ejemplo, diferencias de metilación o SNP.

En determinados modos de realización, los productos de ligación se escinden (por ejemplo, usando mecanismos de escisión enzimática tales como una endonucleasa de restricción) para reducir el tamaño del producto de ligación mientras se deja la región de captura y la región de unión a marcador disponibles para la detección. En determinados aspectos, se produce la escisión después de la amplificación universal.

En modos de realización preferentes, los locus y los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados a los locus se aíslan de los oligonucleótidos de secuencia fija no unidos después de la hibridación para retirar el exceso de oligonucleótidos no unidos en la reacción; por ejemplo, a través de una etapa de lavado o degradación enzimática de los oligonucleótidos no unidos.

Los primer y segundo conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija usados en los procedimientos comprenden preferentemente (además de al menos una región de captura) regiones de cebadores universales que se pueden usar para amplificar los productos de ligación. De forma alternativa, se pueden añadir secuencias de cebadores universales a los extremos de los productos de ligación después de la ligación, por ejemplo, a través de la introducción de adaptadores que comprenden secuencias de cebadores universales.

En determinados aspectos, los oligonucleótidos de secuencia fija de la invención comprenden uno o más índices. Estos índices pueden servir, además de las regiones de captura, como secuencias sustitutas para identificar los locus, o un alelo particular de un locus. En particular, estos índices pueden servir como secuencias de identificación sustitutas para detectar la hibridación del producto de ligación o amplicones del mismo a una matriz. En procedimientos específicos, el primer o segundo oligonucleótido de secuencia fija en cada conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija comprende un índice de alelo que asocia un alelo específico con el oligonucleótido de secuencia fija.

En determinados aspectos específicos, el procedimiento se lleva a cabo para al menos 50 locus de cada región genómica diana, más preferentemente entre 50-100 locus, más preferentemente entre 100-200 locus, más preferentemente entre 200-500 locus, más preferentemente entre 500-1000 locus, preferentemente entre 1000-2000 locus, preferentemente entre 2000-5000 locus, y preferentemente entre 5000-10.000 locus de una región genómica diana, o cualquier intervalo intermedio en el mismo. En determinados aspectos, además de las regiones genómicas diana, se interrogan al menos 50 locus polimórficos seleccionados. Más preferentemente, se interrogan entre 50-100 locus polimórficos seleccionados, más preferentemente se interrogan entre 100-200 locus polimórficos seleccionados, más entre 200-500 locus polimórficos seleccionados, más entre 500-1000 locus polimórficos seleccionados, entre 1000-2000 locus polimórficos seleccionados, entre 2000-5000 locus polimórficos seleccionados, y entre 5000-10.000 locus polimórficos seleccionados, incluyendo todos los intervalos intermedios.

En otros aspectos, se estima que los procedimientos de ensayo detectan al menos 5 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana, más preferentemente al menos 10 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana, más preferentemente al menos 20 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana, preferentemente al menos 50 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana, más preferentemente al menos 100 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana, más preferentemente al menos 200 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana. En algunos modos de realización, no se detectan más de 5000 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana para cada muestra. En otros modos de realización, no se detectan más

de 2000 regiones de captura correspondientes a cada locus dentro de una región genómica diana para cada muestra. Estos aspectos y otros rasgos y ventajas de la invención se describen con más detalle a continuación.

5 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que describe un aspecto general de la invención.

10 La FIG. 2 ilustra un modo de realización de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de locus.

La FIG. 3 ilustra un modo de realización alternativo de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de locus.

15 La FIG. 4 ilustra otro modo de realización alternativo de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de locus.

La FIG. 5 ilustra aún otro modo de realización alternativo de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de locus.

20 La FIG. 6 ilustra otro modo de realización alternativo de un procedimiento de la invención que utiliza oligonucleótidos puente en combinación con oligonucleótidos de secuencia fija y detección de hibridación de locus.

25 La FIG. 7 ilustra otro modo de realización alternativo de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de locus para detectar polimorfismos.

La FIG. 8 ilustra otro modo de realización alternativo de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de locus para detectar polimorfismos.

30 La FIG. 9 ilustra otro modo de realización alternativo de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de regiones de ácido nucleico para detectar polimorfismos.

La FIG. 10 ilustra un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de regiones de ácido nucleico con un oligonucleótido puente y doble escisión.

35 La FIG. 11 de un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de regiones de ácido nucleico con un oligonucleótido puente y doble escisión para detectar polimorfismos.

La FIG. 12 ilustra un procedimiento de la invención que utiliza la detección de hibridación de regiones de ácido nucleico resultantes de un único acontecimiento de escisión y que emplea cebadores universales marcados diferencialmente.

40 La FIG. 13 ilustra un procedimiento alternativo al ilustrado en la figura 12 que también utiliza la detección de hibridación de regiones de ácido nucleico resultantes de un único acontecimiento de escisión y que emplea cebadores universales marcados diferencialmente.

45 La FIG. 14 muestra la distribución de la variabilidad de ensayo entre muestras para matrices y secuenciación de próxima generación.

50 **Definiciones**

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

55 El término "índice de alelo" se refiere en general a una serie de nucleótidos que corresponde a un SNP específico. El índice de alelo puede contener nucleótidos adicionales que permiten la detección de la delección, sustitución o inserción de una o más bases. El índice de alelo se puede combinar con cualquier otro índice para crear un índice que proporcione información para dos propiedades (por ejemplo, índice de muestra-identificación, índice de alelo-locus).

60 "Matriz" se refiere a un soporte en fase sólida que tiene una superficie, preferentemente pero no exclusivamente una superficie plana o sustancialmente plana, que lleva una matriz de sitios que contienen ácidos nucleicos de modo que cada sitio de la matriz comprende copias idénticas o sustancialmente idénticas de oligonucleótidos o polinucleótidos y está espacialmente definida y no se superpone con otros sitios miembros de la matriz; es decir, los sitios son espacialmente distintos. La matriz o micromatriz también puede comprender una estructura interrogable no plana con una superficie tal como una microesfera o un pocillo. Los oligonucleótidos o polinucleótidos de la matriz se pueden

unir de forma covalente al soporte sólido, o se pueden unir de forma no covalente. La tecnología de micromatrices convencional se revisa, por ejemplo, en Schena, Ed., *Microarrays: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (2000). "Análisis de matriz", "análisis por matriz" o "análisis por micromatriz" se refiere a análisis, tal como, por ejemplo, análisis de secuencia, de una o más moléculas biológicas usando una matriz. El término matriz se refiere a cualquier formato de sustratos sólidos agrupados, incluyendo una micromatriz, microesferas agrupadas, una matriz de moléculas dentro de pocillos o matrices "líquidas".

El término "par de unión" quiere decir cualquiera de dos moléculas que se unen específicamente entre sí usando unión covalente y/o no covalente, y que se pueden usar, por ejemplo, para la unión de material genético a un sustrato. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ligandos y sus compañeros de unión a proteínas, por ejemplo, biotina y avidina, biotina y estreptavidina, un anticuerpo y su epítipo particular, y similares.

El término "anomalía cromosómica" se refiere a cualquier variante genética para todo o parte de un cromosoma. Las variantes genéticas pueden incluir, pero no se limitan a, cualquier variante en el número de copias tal como duplicaciones o deleciones, translocaciones, inversiones y mutaciones.

Los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a moléculas de ácido nucleico (es decir, una secuencia de nucleótidos) que están relacionadas por reglas de emparejamiento de bases. Los nucleótidos complementarios son, en general, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos moléculas de ARN o ADN monocatenarias son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una hebra óptimamente alineados y con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, se emparejan con al menos de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 95 % de complementariedad, y más preferentemente de aproximadamente un 98 % a aproximadamente un 100 % de complementariedad, e incluso más preferentemente con un 100 % de complementariedad. De forma alternativa, existe complementariedad sustancial cuando una hebra de ARN o ADN se hibride en condiciones de hibridación selectiva con su complemento. Las condiciones de hibridación selectiva incluyen, pero no se limitan a, condiciones de hibridación rigurosa. Las condiciones de hibridación rigurosa incluirán típicamente concentraciones salinas de menos de aproximadamente 1 M, más normalmente menos de aproximadamente 500 mM y preferentemente menos de aproximadamente 200 mM. En general, las temperaturas de hibridación son al menos de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 6 °C menores que las temperaturas de fusión ( $T_m$ ).

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

El término "hibridación" quiere decir en general la reacción por la que se produce el emparejamiento de hebras complementarias de ácido nucleico. Normalmente el ADN es bicatenario, y cuando las hebras se separan, se rehibridarán 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 sean, menos estables serán (y menos probable que se formen).

Como se usa en el presente documento, el término "ligasa" se refiere en general a una clase de enzimas, las ADN ligasas (típicamente ADN ligasa T4), que pueden unir conjuntamente trozos de ADN. Los trozos deben tener extremos compatibles (con ambos romos o bien con extremos de adhesión mutuamente compatibles) y la reacción requiere ATP. La "ligación" es el proceso de unir dos trozos de ADN.

El término "locus" como se usa en el presente documento se refiere a una región de ácido nucleico de localización conocida en un genoma.

El término "muestra materna" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier muestra tomada de un mamífero gestante que comprende ADN sin células tanto fetales como maternas. Preferentemente, las muestras maternas para su uso en la invención se obtienen a través de medios relativamente no invasivos, por ejemplo, extracción u otras técnicas estándar para extraer muestras periféricas de un sujeto.

El término "oligonucleótidos" u "oligos" como se usa en el presente documento se refiere a oligómeros lineales de monómeros de ácido nucleico naturales o modificados, incluyendo desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, formas anómeros de los mismos, monómeros de ácido peptidonucleico (PNA), monómeros de ácido nucleico bloqueado (LNA), y similares, o una combinación de los mismos, que se pueden unir específicamente a un polinucleótido monocatenario por medio de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tal como el tipo de emparejamiento de bases de Watson-Crick, apilamiento de bases, tipos de emparejamiento de bases de Hoogsteen o Hoogsteen inverso, o similares. Normalmente, los monómeros se unen por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño de unas pocas unidades monómeras, por ejemplo, 8-12, a varias decenas de unidades monómeras, por ejemplo, 100-200 o más. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas se pueden preparar por el procedimiento de fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers (Tetrahedron Lett., 22:1859-1862 (1981)), o por el procedimiento de triéster de acuerdo con Matteucci, *et al.* (J. Am. Chem. Soc., 103:3185 (1981)), o por otros procedimientos químicos tales como el uso de un sintetizador de oligonucleótidos automatizado

comercial.

Como se usa en el presente documento, "nucleótido" se refiere a una combinación de base-glúcido-fosfato. Los nucleótidos son unidades monómeras de una secuencia del ácido nucleico (ADN y ARN). El término nucleótido incluye los ribonucleósidos trifosfatos ATP, UTP, CTG, GTP y los desoxirribonucleósidos trifosfatos tales como dATP, dCTP, dTTP, dUTP, dGTP, dTTP o derivados de los mismos. Dichos derivados incluyen, por ejemplo, [ $\alpha$ S]dATP, 7-desaza-dGTP y 7-desaza-dATP, y derivados de nucleótidos que confieren resistencia a la nucleasa en la molécula de ácido nucleico que los contiene. El término nucleótido como se usa en el presente documento también se refiere a didesoxirribonucleósidos trifosfatos (ddNTP) y sus derivados. Los ejemplos ilustrados de didesoxirribonucleósidos trifosfatos incluyen, pero no se limitan a, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP y ddTTP.

Como se usa en el presente documento, el término "polimerasa" se refiere a una enzima que une nucleótidos individuales conjuntamente en una hebra larga, usando otra hebra como molde. Existen dos tipos generales de polimerasa: las ADN polimerasas, que sintetizan ADN, y las ARN polimerasas, que sintetizan ARN. Dentro de estas dos clases, existen numerosos subtipos de polimerasas, dependiendo del tipo de ácido nucleico pueden funcionar como molde y de qué tipo de ácido nucleico se forma.

Como se usa en el presente documento, "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a una técnica para replicar un trozo específico de ADN diana *in vitro*, incluso en presencia de un exceso de ADN no específico. Se añaden cebadores al ADN diana, donde los cebadores inician la copia del ADN diana usando nucleótidos y, típicamente, polimerasa Taq o similares. Realizando ciclos de la temperatura, el ADN diana se desnaturaliza y se copia repetidamente. Se puede amplificar una única copia del ADN diana, incluso si se mezcla con otro ADN aleatorio, 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 trozos de ADN personalizados. En algunos casos, se pueden usar procedimientos de amplificación lineal como alternativa a la PCR.

El término "polimorfismo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier variante o cambio genético en un locus que pueda ser indicativo de ese locus particular, incluyendo, pero sin limitarse a, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), diferencias de metilación, repeticiones en tándem cortas (STR) y similares.

En general, un "cebador" es un oligonucleótido usado, por ejemplo, para cebar la extensión, ligación 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 del cebador. También se puede usar un cebador en técnicas de hibridación como un medio para proporcionar complementariedad de una región de ácido nucleico a un oligonucleótido de captura para la detección de una región de ácido nucleico específica.

El término "herramienta de investigación", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición o sistema de la invención usado para investigación científica, de naturaleza académica o comercial, incluyendo el desarrollo de tratamientos farmacéuticos y/o biológicos. Las herramientas de investigación de la invención no están destinadas a ser terapéuticas ni a estar sujetas a autorización de registro sanitario; más bien, las herramientas de investigación de la invención están destinadas a facilitar la investigación y ayudar en dichas actividades de desarrollo, incluyendo cualquier actividad realizada con la intención de producir información para respaldar una presentación de expediente de registro.

El término "muestra" se refiere a cualquier muestra que comprende toda o una porción de la información genética de un organismo, incluyendo, pero sin limitarse a, virus, bacterias, hongos, plantas y animales, y en particular mamíferos. La información genética que se puede interrogar dentro de una muestra genética incluye ADN genómico (regiones tanto codificantes como no codificantes), ARN, ADN mitocondrial y productos de ácido nucleico derivados de cada uno de estos. Dichos productos de ácido nucleico incluyen ADNc creado a partir de ARNm o productos de preamplificación para incrementar el material para análisis.

El término "región genómica diana" se refiere a todo o una porción de un cromosoma o cromosomas, incluyendo cromosomas completos, regiones subcromosómicas, grupos de locus y locus individuales.

## Descripción detallada de la invención

La práctica de las técnicas descritas en el presente documento puede emplear, a menos que se indique de otro modo, técnicas y descripciones convencionales de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica y tecnología de matrices, que están dentro de la habilidad de los expertos en la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen síntesis de matriz polimérica, hibridación y ligación de polinucleótidos, 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 por supuesto otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio estándar tales como Green, *et al.*, Eds. (1999), *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), *Genetic Variation: A Laboratory Manual*; Dieffenbach, Dveksler, Eds. (2003), *PCR Primer: A Laboratory Manual*; Bowtell y Sambrook (2003), *DNA Microarrays*;

*A Molecular Cloning Manual*; Mount (2004), *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*; Sambrook y Russell (2006), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; y Sambrook y Russell (2002), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4.ª ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Gait, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* 1984, IRL Press, London; Nelson y Cox (2000), *Lehninger, Principles of Biochemistry* 3.ª ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; y Berg *et al.* (2002) *Biochemistry*, 5.ª ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.

Cabe destacar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un alelo" se refiere a una o más copias del alelo con diversas variaciones de secuencia, y la referencia a "el sistema de detección" incluye referencia a etapas y procedimientos equivalentes conocidos para los expertos en la técnica, etc.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido se engloba dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los intervalos más pequeños, y también se engloban dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de los dos límites incluidos también se incluyen en la invención.

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 técnica que la presente invención se puede practicar sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito rasgos y procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica para evitar confundir la invención.

### La invención en general

La invención proporciona procedimientos de ensayo para identificar variantes en el número de copias de regiones de ácido nucleico (incluyendo locus, conjuntos de locus y regiones genómicas diana más grandes, por ejemplo, cromosomas), incluyendo inserciones, deleciones, translocaciones, mutaciones y polimorfismos en una muestra genética. En un aspecto, los procedimientos de ensayo interrogan locus de dos o más regiones genómicas diana en una muestra usando un ensayo de ligación dirigido seguido de la detección de oligonucleótidos marcados unidos a una matriz. La cuantificación de los oligonucleótidos marcados permite la determinación de un número de copias atípico de una región genómica diana particular en base a una comparación entre las cantidades de locus detectados de las regiones genómicas diana (por ejemplo, comparación entre dos o más porciones de un único cromosoma o comparación entre dos o más cromosomas diferentes) en la muestra o en comparación con un cromosoma de referencia de la misma muestra o de una diferente.

En algunos modos de realización, el procedimiento emplea el análisis dirigido de regiones genómicas diana en una muestra usando conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija que se hibridan selectivamente a locus dentro de dos o más regiones genómicas diana. Los oligonucleótidos de secuencia fija se ligan directa o indirectamente para crear productos de ligación. Los productos de ligación correspondientes a los locus asociados con una primera región genómica diana se asocian con un primer marcador detectable y los productos de ligación correspondientes a los locus asociados con una segunda región genómica diana se asocian con un segundo marcador detectable. Si se cuantifican los primer y segundo marcadores detectables, se puede determinar la frecuencia relativa de cada una de las primera y segunda regiones genómicas diana. En determinados aspectos de la invención, el procedimiento emplea dos marcadores diferentes que se usan para identificar dos regiones genómicas diana diferentes. En otros aspectos de la invención, el procedimiento emplea tres marcadores diferentes correspondientes a tres regiones genómicas diana diferentes, y así sucesivamente.

Los productos de ligación se detectan por hibridación, y en particular por hibridación a una matriz de sondas de captura complementarias a las regiones de captura presentes en los productos de ligación. En determinados modos de realización, los productos de ligación se detectan usando "matrices universales" que comprenden casillas que tienen las mismas sondas de captura o sustancialmente similares. En determinados otros modos de realización, las matrices comprenden dos o más conjuntos de múltiples casillas con una secuencia común, teniendo cada conjunto una secuencia diferente, por ejemplo, una matriz donde hasta cientos de las casillas en la matriz tienen sustancialmente la misma secuencia. En cualquier caso, las sondas de captura en la matriz son complementarias a las regiones de captura de los productos de ligación en lugar de a la secuencia de los locus o sus complementos. Estas matrices se pueden usar para interrogar cualquier locus para cualquier región genómica diana independientemente de la secuencia de los locus.

Las regiones de captura se introducen preferentemente en los productos de ligación en los oligonucleótidos de

secuencia fija que se usan para interrogar los locus en la muestra. En algunos modos de realización preferentes, las regiones de captura son las mismas entre todos los oligonucleótidos de secuencia fija usados, de modo que los productos de ligación o amplicones o productos de escisión de los mismos de todos los locus se hibridan competitivamente a las sondas de captura de la misma secuencia en la matriz. En otros modos de realización, la matriz está compuesta de muchas sondas de captura diferentes, y los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija de diferentes locus comprenden diferentes regiones de captura.

La fig. 1 es un diagrama de flujo 100 que ilustra un procedimiento ejemplar de la invención. En la etapa 102, se proporciona una muestra. En la etapa 104, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija que comprenden una región de unión a marcador se introducen en la muestra en condiciones que permiten que los oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden a los locus en regiones genómicas diana, y en la etapa 106 los oligonucleótidos se hibridan a las regiones genómicas diana. En la etapa 108, los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados de cada conjunto se ligan para crear productos de ligación que a continuación se amplifican en la etapa 110 para producir amplicones complementarios a los productos de ligación. En la etapa 112, los amplicones se introducen en una matriz de hibridación y se permite que se hibriden competitivamente a sondas de captura en la matriz. En la etapa 114, se introduce un conjunto de oligonucleótidos marcados en los amplicones y se permite que se hibriden a secuencias complementarias en los amplicones. Opcionalmente, los oligonucleótidos marcados se ligan a la sonda de captura en la matriz (no mostrado). En la etapa 116, se detectan los marcadores.

Cada oligonucleótido de secuencia fija de cada conjunto comprende una región complementaria a un locus seleccionado (como se describe con más detalle en la figura 2). Al menos un oligonucleótido de secuencia fija de cada conjunto comprende además una región de captura, que puede ser la misma para todos los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija usados para interrogar a dos o más regiones genómicas diana, puede ser la misma para pares de conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija usados para interrogar a dos o más regiones genómicas diana, o puede ser diferente entre conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija para regiones genómicas diana individuales. Adicionalmente, dependiendo del modo de realización, un oligonucleótido de secuencia fija de un conjunto comprende un marcador detectable o bien una región de unión a marcador para la asociación del oligonucleótido de secuencia fija con el marcador detectable. En modos de realización específicos, la región de unión a marcador puede ser una región complementaria a un oligonucleótido marcado asociado con un marcador detectable.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido de secuencia fija de cada conjunto que comprende la región de captura no comprenderá el marcador o región de unión a marcador; es decir, el otro oligonucleótido de secuencia fija del conjunto comprende el marcador o región de unión a marcador (véase, por ejemplo, modos de realización ejemplares ilustrados en las fig. 2, 3 y 5-8); en otros modos de realización, el oligonucleótido de secuencia fija de cada conjunto que comprende la región de captura también comprenderá el marcador o región de unión a marcador (véase, por ejemplo, el modo de realización ejemplar ilustrado en la fig. 4).

En determinados aspectos específicos, un primer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija se hibrida a los locus en una primera región genómica diana, mientras que un segundo conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija se hibrida a los locus en una segunda región genómica diana. Después de la ligación para producir productos de ligación, los productos de ligación se amplifican opcionalmente usando cebadores universales y a continuación se hibridan a una matriz. En otros modos de realización, el producto de amplificación se escinde (por ejemplo, usando una endonucleasa de restricción) y una porción del producto de amplificación que comprende la región de captura se introduce en la matriz para hibridación y detección. En modos de realización preferentes, cada conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija usados para interrogar a una región genómica diana contiene el mismo marcador o región de unión a marcador. Es decir, todos los oligonucleótidos de secuencia fija del primer conjunto se asocian con un primer marcador, todos los oligonucleótidos de secuencia fija del segundo conjunto se asocian con un segundo marcador, y todos los oligonucleótidos de secuencia fija en un tercer conjunto se asocian con un tercer marcador.

Si los oligonucleótidos de secuencia fija se marcan directamente, los productos de ligación, amplicones o productos de escisión de los mismos se pueden hibridar a las sondas de captura en la matriz y detectarse por la lectura de los marcadores. Si los oligonucleótidos de secuencia fija contienen en cambio una región de unión a marcador que es complementaria a un oligonucleótido marcado (una "secuencia de unión a marcador"), se debe añadir un oligonucleótido marcado al producto de ligación o amplicones antes de la detección. En cualquier escenario, a continuación los marcadores se detectan y se cuantifican y se determina la frecuencia relativa de cada marcador. La cuantificación de cada marcador permite la cuantificación de cada región genómica diana.

En algunos modos de realización, todos los conjuntos de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija contienen sustancialmente la misma región de captura. En estos modos de realización, debido a que los productos de ligación de todos los locus de todas las regiones genómicas diana comparten la misma región de captura complementaria a las sondas de captura en la matriz, los productos de ligación de cada región genómica diana compiten para hibridarse a las sondas de captura en una matriz universal.

En otros modos de realización, las sondas de captura en una matriz comprenden múltiples secuencias complementarias a diferentes regiones de captura, y la matriz comprende casillas que contienen estas sondas de captura diferentes. En algunos de dichos modos de realización, cada sonda de captura se puede hibridar a una región

de captura única. En otros de dichos modos de realización, más de una sonda de captura, que representa los locus de diferentes regiones genómicas, se puede hibridar a una única región de captura.

En otros modos de realización, se pueden configurar diferentes locus de las mismas o diferentes regiones genómicas diana para hibridarse competitivamente uno frente a otro y, por tanto, comprenderían la misma región de captura, mientras que se pueden configurar otros locus de las mismas o diferentes regiones genómicas diana para hibridarse competitivamente uno frente a otro, dependiendo del ensayo.

Las regiones genómicas diana pueden ser regiones genómicas grandes, tales como cromosomas completos, o pueden ser regiones genómicas más pequeñas, tales como subregiones de un único cromosoma o subregiones en diferentes cromosomas, incluso hasta un único locus. Por tanto, la invención se puede usar para detectar variaciones genómicas tales como aneuploidías y aneuploidías parciales, así como mutaciones, SNP, reordenamientos, inserciones y deleciones. En el caso donde se comparan cromosomas completos, la primera región genómica diana puede ser, por ejemplo, el cromosoma 21, y todos los locus que se van a interrogar con el primer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija serán del cromosoma 21.

En el ensayo de ligación, si los oligonucleótidos de secuencia fija se unen a regiones inmediatamente adyacentes en un locus seleccionado, los oligonucleótidos fijos se pueden ligar para crear productos de ligación que se asocian con marcadores específicos de región genómica diana. En el caso donde los oligonucleótidos de secuencia fija no se unen a regiones inmediatamente adyacentes dentro de la región genómica (es decir, existe un hueco entre los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados) el hueco se puede cerrar usando la extensión del cebador y/o uno o más oligonucleótidos puente. Una vez que los oligonucleótidos se hibridan contiguamente, directamente o bien después de una operación de extensión o introducción de un oligonucleótido puente, a continuación se pueden ligar para crear productos de ligación que se asocian con marcadores específicos de región genómica diana.

En determinados aspectos, un primer conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija es selectivo para un primer cromosoma o una primera región genómica diana y un segundo conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija es selectivo para un cromosoma o segunda región genómica diana diferente. La fig. 2 ilustra un modo de realización en el que cada conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija marcados se hibrida a los locus en diferentes cromosomas y los productos de ligación se evalúan competitivamente en una matriz que comprende sondas de captura. Se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija marcados 202, 204, teniendo cada conjunto un primer oligonucleótido de secuencia fija 206, 208 que comprende una secuencia que es complementaria a un locus seleccionado 210, 212 y un marcador 214, 216 y un segundo oligonucleótido de secuencia fija 218, 220 que comprende una secuencia complementaria al locus seleccionado 222, 224 y una región de captura 226, 228. Los marcadores 214, 216 son diferentes para cada conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija para permitir la diferenciación entre la primera región genómica diana (en este caso, un primer cromosoma) y la segunda región genómica diana (en este caso, un segundo cromosoma) durante la detección. En la etapa 230, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 202, 204 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden a los locus 232, 234 en dos cromosomas diferentes. Después de la hibridación, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra (no mostrado). En la etapa 236, los oligonucleótidos de secuencia fija se ligan para crear productos de ligación 238, 240 que comprenden las regiones de captura 226, 228 y los marcadores 214, 216. Aunque los oligonucleótidos de secuencia fija se ilustran en la FIG. 2 como hibridados de forma adyacente en los locus, también puede existir un hueco que se puede llenar, por ejemplo, usando una reacción de extensión o usando un oligonucleótido puente que se hibrida de forma adyacente entre los oligonucleótidos de secuencia fija. En la etapa 242, los productos de ligación 238, 240 se introducen en una matriz de hibridación 244 que comprende una pluralidad de sondas de captura 246 en las que las regiones de captura 226, 228 de los productos de ligación 238, 240 se hibridan competitivamente a las sondas de captura 246. En un modo de realización preferente, 226 y 228 tienen sustancialmente la misma secuencia. Después de la hibridación de los productos de ligación a la matriz, los productos de ligación no hibridados se retiran preferentemente de la matriz (no mostrado). Los marcadores 214, 216 se pueden detectar a continuación usando un mecanismo de detección apropiado dependiendo del tipo de marcador usado y los locus correspondientes a cada uno de los primer y segundo cromosomas se pueden cuantificar para determinar la presencia y cantidad de cada cromosoma en la muestra genética.

De acuerdo con la presente invención, un "nucleótido" puede estar no marcado o marcado de forma detectable por técnicas bien conocidas. Los marcadores fluorescentes y su unión a oligonucleótidos se describen en muchas reseñas, incluyendo Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 9.<sup>a</sup> ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR (2002); Keller y Manak, *DNA Probes*, 2.<sup>a</sup> ed., Stockton Press, New York (1993); Eckstein, Ed., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991); Wetmur, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26:227-259 (1991); y similares. Otras metodologías aplicables a la invención se divulgan en la siguiente muestra de referencias: Fung *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.757.141; Hobbs, Jr., *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.151.507; Cruickshank, patente de EE. UU. n.º 5.091.519; Menchen *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.188.934; Begot *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.366.860; Lee *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.847.162; Khanna *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.318.846; Lee *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.800.996; Lee *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.066.580; Mathies *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.688.648; y similares. El marcaje también se puede llevar a cabo con puntos cuánticos, como se divulga en las siguientes patentes y publicaciones de patente: patentes de EE. UU. n.º

6.322.901; 6.576.291; 6.423.551; 6.251.303; 6.319.426; 6.426.513; 6.444.143; 5.990.479; 6.207.392; 2002/0045045; y 2003/0017264. Los marcadores detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes y marcadores enzimáticos. Los marcadores fluorescentes de nucleótidos pueden incluir, pero no se limitan a, fluoresceína, 5-carboxifluoresceína (FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), rodamina, 6-carboxirrodamina (R6G), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL), CASCADE BLUE® (ácido pireniloxitrisulfónico), OREGON GREEN™ (2',7'-difluorofluoresceína), TEXAS RED™ (sulforrodamina 101, cloruro de ácido), cianina y ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS). Los ejemplos específicos de nucleótidos marcados de forma fluorescente incluyen [R6G]dUTP, [TAMRA]dUTP, [R110]dCTP, [R6G]dCTP, [TAMRA]dCTP, [JOE]ddATP, [R6G]ddATP, [FAM]ddCTP, [R110]ddCTP, [TAMRA]ddGTP, [ROX]ddTTP, [dR6G]ddATP, [dR110]ddCTP, [dTAMRA]ddGTP y [dROX]ddTTP disponibles de Perkin Elmer, Foster City, Calif. FluoroLink desoxinucleótidos, FluoroLink Cy3-dCTP, FluoroLink Cy5-dCTP, FluoroLink FluorX-dCTP, FluoroLink Cy3-dUTP y FluoroLink Cy5-dUTP disponibles de Amersham, Arlington Heights, IL; fluoresceína-15-dATP, fluoresceína-12-dUTP, tetrametil-rodamina-6-dUTP, IR770-9-dATP, fluoresceína-12-ddUTP, fluoresceína-12-UTP y fluoresceína-15-2'-dATP disponibles de Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; y nucleótidos marcados en cromosomas, BODIPY-FL-14-UTP, BODIPY-FL-4-UTP, BODIPY-TMR-14-UTP, BODIPY-TMR-14-dUTP, BODIPY-TR-14-UTP, BODIPY-TR-14-dUTP, CASCADE BLUE®-7-UTP (ácido pireniloxitrisulfónico-7-UTP), CASCADE BLUE®-7-dUTP (ácido pireniloxitrisulfónico-7-dUTP), fluoresceína-12-UTP, fluoresceína-12-dUTP, OREGON GREEN™ 488-5-dUTP (2',7'-difluorofluoresceína-5-dUTP), RHODAMINE GREEN™-5-UTP ((5-{2-[4-(aminometil)fenil]-5-(piridin-4-il)-1H-i-5-UTP])), RHODAMINE GREEN™-5-dUTP ((5-{2-[4-(aminometil)fenil]-5-(piridin-4-il)-1H-i-5-UTP])), tetrametilrodamina-6-UTP, tetrametilrodamina-6-dUTP, TEXAS RED™-5-UTP (sulforrodamina 101, cloruro de ácido-5-UTP), TEXAS RED™-5-dUTP (sulforrodamina 101, cloruro de ácido-5-dUTP) y TEXAS RED™-12-dUTP (sulforrodamina 101, cloruro de ácido-12-dUTP) disponibles de Molecular Probes, Eugene, OR.

En determinados aspectos de la invención, los ácidos nucleicos de la muestra se asocian con un sustrato (por ejemplo, usando pares de unión tales como, por ejemplo, biotina y estreptavidina, para unir el material genético a la superficie de sustrato o unión covalente directa) antes de añadir los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija a la muestra. En resumen, un primer miembro de un par de unión (por ejemplo, biotina) se puede asociar con ácidos nucleicos de la muestra, y los ácidos nucleicos unirse a un sustrato por medio de un segundo miembro del par de unión (por ejemplo, avidina o estreptavidina) en la superficie del sustrato. La unión de los ácidos nucleicos de la muestra puede ser particularmente útil en la retirada de oligonucleótidos no hibridados después de la hibridación de los oligonucleótidos de secuencia fija y/o los oligonucleótidos puente a los locus. En resumen, los ácidos nucleicos de la muestra se pueden hibridar a los oligonucleótidos de secuencia fija, y a continuación los complejos de hibridación se unen posteriormente a un sustrato. De forma alternativa, los ácidos nucleicos de la muestra se pueden unir a un soporte sólido antes de la hibridación de los oligonucleótidos de secuencia fija o al mismo tiempo. De cualquier manera, después de la hibridación y unión de los ácidos nucleicos a un soporte sólido, o de forma alternativa después de la ligación de los oligonucleótidos hibridados, la superficie del soporte se puede tratar para retirar cualquier oligonucleótido no hibridado o no ligado, por ejemplo, por lavado u otros procedimientos de retirada tales como degradación de oligonucleótidos como se analiza en Willis *et al.*, patentes de EE. UU. n.º 7.700.323 y 6.858.412. La degradación de los oligonucleótidos es un aspecto preferente cuando los dos oligonucleótidos de secuencia fija están en la misma sonda de modo que la ligación da como resultado una sonda circular. A continuación se pueden usar exonucleasas para degradar ácidos nucleicos no circulares, incluyendo exceso de sondas y ADN de muestra.

Existen una serie de procedimientos que se pueden usar para asociar ácidos nucleicos con pares de unión. Por ejemplo, se pueden usar numerosos procedimientos para marcar ácidos nucleicos con biotina, incluyendo fotobiotinilación aleatoria, marcaje de extremos con biotina, replicación con nucleótidos biotinilados y replicación con un cebador marcado con biotina.

El número de locus analizados para cada cromosoma en los procedimientos de la invención puede variar de dos a 20.000 o más por región genómica diana analizada. En un aspecto preferente, el número de locus por región genómica diana está entre 48 y 1000. En otro aspecto, el número de locus por región genómica diana es de al menos 100. En otro aspecto, el número de locus por región genómica diana es de al menos 400. En otro aspecto, el número de locus por región genómica diana no es más de 1000. En otro aspecto, el número de locus por región genómica diana es de al menos 500 pero no más de 2000.

Aunque el modo de realización ilustrado en la FIG. 2 usa oligonucleótidos de secuencia fija acoplados directamente a un marcador detectable, se puede proporcionar, en cambio, un marcador por un oligonucleótido marcado separado que se hibrida a los productos de ligación de los oligonucleótidos de secuencia fija o amplicones o amplicón escindido (como se describe a continuación) de los mismos, para permitir la detección. Opcionalmente, el oligonucleótido marcado se liga a la sonda de captura después de la hibridación a los oligonucleótidos de secuencia fija o amplicones o amplicón escindido. La fig. 3 es una ilustración de un modo de realización de la invención en el que los oligonucleótidos de secuencia fija se hibridan a los locus de interés, se ligan, se amplifican y se introducen en una matriz antes de la hibridación de un oligonucleótido marcado y la detección del marcador. En el procedimiento representado en la FIG. 3, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 302, 304, en el que los conjuntos comprenden un primer oligonucleótido de secuencia fija 306, 308 que comprende cada uno secuencias complementarias a un locus seleccionado 310, 312, región de unión a marcador 314, 316 y regiones de cebadores

universales 318, 320; y un segundo oligonucleótido de secuencia fija 322, 324 que comprende secuencias complementarias al locus seleccionado 326, 328, una región de captura 330, 332 y una región de cebador universal 334, 336. En muchos modos de realización, la región de captura 330, 332 comprende sustancialmente la misma secuencia y ambas se hibridarán a la misma sonda de captura en una matriz. Las regiones de unión a marcador 314, 316 comprenden secuencias que son diferentes para cada conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija 302, 304 permitiendo el marcaje diferencial de los oligonucleótidos de secuencia fija asociados con los locus para cada región genómica diana, mientras que las regiones de captura 330, 332 son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 302, 304 para permitir la hibridación competitiva de los productos de ligación a casillas de captura en una matriz. En la etapa 338, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 302, 304 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden a los locus 340, 342 de diferentes regiones genómicas diana. Después de la hibridación, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra genética (no mostrado).

En la etapa 344, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 302, 304 se ligan para crear los productos de ligación 346, 348. En la etapa 358, los cebadores universales 350, 352, 354 y 356 se introducen en los productos de ligación 346, 348 que se unen a las regiones de cebadores universales 318, 334, 320 y 336, respectivamente, y crean los amplicones 360, 362, comprendiendo cada uno las regiones de captura 364, 366 y las regiones de unión a marcador 368, 370. En determinados modos de realización preferentes, 350 y 354 tienen sustancialmente la misma secuencia, que es complementaria tanto a 318 como a 320, y 352 y 356 tienen sustancialmente la misma secuencia, que es complementaria tanto a 334 como a 336. Los amplicones se introducen en una matriz de hibridación 372 que comprende una pluralidad de sondas de captura 374 en las que las regiones de captura 364, 366 de los amplicones 360, 362 se hibridan a las sondas de captura 374. En la etapa 378, los oligonucleótidos marcados 380, 382 se introducen en la matriz 372 donde las regiones de unión a marcador 368, 370 de los amplicones 360, 362 se hibridan a las regiones de reconocimiento diana 384, 386 de los oligonucleótidos marcados 380, 382. Opcionalmente, los oligonucleótidos marcados se ligan a la sonda de captura en la matriz (no mostrado). Después de la hibridación de los oligonucleótidos marcados, los oligonucleótidos marcados no hibridados se separan preferentemente de la matriz (no mostrado). A continuación se pueden detectar los marcadores y cuantificar los locus correspondientes a cada región genómica diana para proporcionar información sobre la presencia y cantidad de cada región genómica diana en la muestra.

En determinados modos de realización, tales como el modo de realización mostrado en la FIG. 3, los oligonucleótidos marcados se hibridan a los oligonucleótidos de secuencia fija, o amplicones o amplicones escindidos de los mismos, después de que los productos de ligación o amplicones o amplicones escindidos se hibridan a una matriz. En otros determinados modos de realización, los oligonucleótidos marcados se hibridan a los oligonucleótidos de secuencia fija, o amplicones o amplicones escindidos de los mismos, antes de la hibridación a una matriz.

Para facilitar la hibridación de productos de ligación o amplicones de los mismos, se puede reducir el tamaño de los productos de ligación o amplicones antes de la hibridación a una matriz. En determinados modos de realización, los productos de ligación se escinden (por ejemplo, usando endonucleasas de restricción u otros mecanismos de escisión enzimática) para reducir el tamaño del producto de ligación que se va a detectar, dejando, por ejemplo, la región de captura y la región de unión a marcador disponibles para la detección. La detección de un producto de ligación marcado escindido o un amplicón escindido sirve como sustituto en lugar de detectar el producto de ligación completo.

La reducción del tamaño de los productos de ligación, amplicones y/o productos de ligación marcados puede facilitar la unión en la matriz, por ejemplo, mejorando la cinética de hibridación y disminuyendo el impedimento estérico. En determinados modos de realización, la reducción en el tamaño de los productos de ligación se logra escindiendo los productos de ligación o amplicones usando una enzima de restricción. Por ejemplo, en determinados modos de realización, uno de los oligonucleótidos de secuencia fija en cada conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija comprende un sitio de reconocimiento de enzima de restricción próximo a la región de captura o región de unión a marcador (o las correspondientes secuencias complementarias de las mismas dependiendo del modo de realización). Se puede usar una enzima de restricción para escindir el producto de ligación en el sitio de reconocimiento de enzima de restricción dejando el marcador o región de unión a marcador y la región de captura disponibles para hibridación y detección. Un sitio de reconocimiento de enzima de restricción se puede localizar en cualquier posición que deje la región de captura y la región de unión a marcador disponibles para detección después de escisión. Por ejemplo, el sitio de reconocimiento de enzima de restricción se puede localizar directamente al lado de la región de captura o la región de unión a marcador o dentro de unas pocas bases de cualquiera de la región de captura o región de unión a marcador. Preferentemente, la escisión se lleva a cabo antes de la hibridación del oligonucleótido marcado a los productos de ligación o amplicones. En determinados otros aspectos, se produce escisión después de la hibridación a la matriz para la detección.

La FIG. 4 es una ilustración de un modo de realización específico de la invención en el que el producto de ligación se escinde antes de la hibridación a una matriz. En el procedimiento representado en la FIG. 4, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 402, 404. Cada conjunto comprende un primer oligonucleótido de secuencia fija 406, 408 que comprende las secuencias complementarias a los locus 410, 412, las regiones de unión a marcador 414, 416, las regiones de captura 418, 420, las regiones de cebadores universales 422, 424 y las regiones del sitio de reconocimiento de enzima de restricción 426, 428. Las regiones de unión a marcador 414, 416 comprenden

secuencias que son diferentes para los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 402, 404 para permitir el marcaje diferencial de oligonucleótidos de secuencia fija asociados con cada región genómica diana diferente, mientras que las regiones de captura 418, 420 en este modo de realización son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 402, 404 para permitir la hibridación competitiva a las casillas de captura de una matriz de hibridación. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 426, 428 pueden ser los mismos para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 402, 404 o diferentes para cada conjunto dependiendo del modo de realización.

En la etapa 442, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 402, 404 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden a los locus elegidos 444, 446. Después de la hibridación y/o ligación, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra (no mostrado). En la etapa 448, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 402, 404 se ligan para crear los productos de ligación 450, 452. En la etapa 454, los cebadores universales 456, 458, 460 y 462 se introducen en los productos de ligación 450, 452 que se unen a las regiones de cebadores universales 422, 438, 424 y 440, respectivamente, para crear los amplicones 464, 466 que comprenden las regiones de unión a marcador 472, 474, las regiones de captura 468, 470 y los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 476, 478. En la etapa 480, se introduce una enzima de restricción en los amplicones 464, 466 que se une al sitio de reconocimiento de enzima de restricción 476, 478 y escinde los amplicones dejando un amplicón escindido 482, 484 que comprende las regiones de unión a marcador 472, 474 y las regiones de captura 468, 470. También en la etapa 480, los amplicones escindidos 482, 484 se introducen en una matriz de hibridación 486 que comprende una pluralidad de sondas de captura 488 donde las regiones de captura 468, 470 de los amplicones escindidos 482, 484 se hibridan competitivamente a las sondas de captura 488. En la etapa 492, los oligonucleótidos marcados 492, 494 se introducen en la matriz 486 donde las regiones de unión a marcador 472, 474 de cada amplicón escindido 482, 484 se hibridan a las regiones de reconocimiento diana 496, 497 de los oligonucleótidos marcados 492, 494. Después de la hibridación de los oligonucleótidos marcados a los amplicones escindidos, los oligonucleótidos marcados no hibridados se separan preferentemente de la matriz (no mostrado). A continuación se pueden detectar los marcadores 498, 499 de los oligonucleótidos marcados 492, 494 y se pueden cuantificar los amplicones escindidos correspondientes a cada región genómica diana para proporcionar información sobre la presencia y cantidad de las regiones genómicas diana en la muestra. Cabe destacar que en la fig. 4 los oligonucleótidos marcados 492, 494 son contiguos a las sondas de captura 488 y, por tanto, los oligonucleótidos marcados 492, 494 se pueden ligar a las sondas de captura 488 para, por ejemplo, incrementar la estabilidad de unión. A continuación, los amplicones escindidos 482, 484 se pueden eliminar de la matriz por lavado.

La FIG. 5 es una ilustración de otro modo de realización específico de la invención en el que el producto de ligación se escinde antes de la hibridación a una matriz. En el procedimiento representado en la FIG. 5, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 502, 504. Cada conjunto comprende un primer oligonucleótido de secuencia fija 506, 508 que comprende las secuencias complementarias a los locus 510, 512, las regiones de unión a marcador 514, 516, las regiones de captura 518, 520, las regiones de cebadores universales 522, 524 y las regiones del sitio de reconocimiento de enzima de restricción 526, 528. Las regiones de unión a marcador 514, 516 comprenden secuencias que son diferentes para los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 502, 504 para permitir el marcaje diferencial de oligonucleótidos de secuencia fija asociados con cada región genómica diana diferente, mientras que las regiones de captura 518, 520 en este modo de realización son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 502, 504 para permitir la hibridación competitiva a las casillas de captura de una matriz de hibridación. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 526, 528 pueden ser los mismos para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 502, 504 o diferentes para cada conjunto dependiendo del modo de realización.

En la etapa 542, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 502, 504 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden a los locus 544, 546. Después de la hibridación, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra (no mostrado). En la etapa 548, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 502, 504 se ligan para crear los productos de ligación 550, 552. En la etapa 554, los cebadores universales 556, 558, 560 y 562 se introducen en los productos de ligación 550, 552 que se unen a las regiones de cebadores universales 522, 538, 524 y 540, respectivamente, para crear los amplicones 564, 566 que comprenden las regiones de unión a marcador 572, 574, las regiones de captura 568, 570 y los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 576, 578. En la etapa 580, se introduce una enzima de restricción en los amplicones 564, 566 que se une al sitio de reconocimiento de enzima de restricción 576, 578 y escinde los amplicones dejando un amplicón escindido 582, 584 que comprende las regiones de unión a marcador 572, 574 y las regiones de captura 568, 570. Los productos escindidos se unen 580 a sus respectivos marcadores 582, 584 y se introducen en una matriz de hibridación 586 que comprende una pluralidad de sondas de captura 588 donde las regiones de captura 568, 570 de los amplicones escindidos se hibridan competitivamente 588 a las sondas de captura 590.

En determinados aspectos de este modo de realización de la invención (y como se ilustra y se analiza en relación con la fig. 4), los oligonucleótidos marcados se pueden ligar a las sondas de captura de la matriz de hibridación para incrementar la estabilidad de unión. Este modo de realización requiere la yuxtaposición del oligonucleótido marcado y la sonda de captura. Las sondas de captura, productos de ligación escindidos y oligonucleótidos marcados se pueden configurar de modo que los oligonucleótidos marcados y las sondas de captura se hibridan de forma adyacente

entre sí, o los oligonucleótidos marcados y las sondas de captura se pueden extender o se puede emplear un oligonucleótido de relleno de hueco como se describe en otra parte en el presente documento.

**Detección de variaciones en el número de copias**

5 Como se establece anteriormente, la invención proporciona procedimientos para identificar variantes en el número de copias de regiones genómicas diana (regiones genómicas relativamente cortas, regiones genómicas más grandes, regiones subcromosómicas y cromosomas), mutaciones y polimorfismos en una muestra. La presente invención proporciona procedimientos particularmente potentes para identificar aneuploidías cromosómicas fetales en muestras maternas que comprenden ADN tanto materno como fetal.

10 Los procedimientos de la invención también se pueden usar para analizar múltiples locus en múltiples cromosomas y promediar la frecuencia de los locus de un cromosoma particular juntos. La normalización o estandarización de las frecuencias se puede realizar para una o más secuencias diana.

15 En algunos aspectos, los procedimientos de la invención se pueden usar para sumar las frecuencias de los locus en cada cromosoma para ambas fuentes en una muestra mixta tal como una muestra de suero materno, por ejemplo, detectando una señal global de un marcador, y a continuación comparando la suma de los marcadores de los locus en un cromosoma con la suma de los marcadores de los locus en otro cromosoma para determinar si existe una anomalía cromosómica. De forma alternativa, se pueden analizar subconjuntos de locus en cada cromosoma para determinar si existe una anomalía cromosómica. La comparación se puede hacer entre regiones del mismo cromosoma o bien entre regiones de diferentes cromosomas.

20 Los datos usados para determinar la frecuencia de los locus pueden excluir datos atípicos que parece que se deben a un error experimental, o que tienen niveles elevados o reducidos en base a un sesgo genético idiopático dentro de una muestra particular. En un ejemplo, los datos usados para la suma pueden excluir regiones de ADN con una frecuencia particularmente elevada en una o más muestras. En otro ejemplo, los datos usados para la suma pueden excluir locus que se encuentran en una abundancia particularmente baja en una o más muestras.

25 Los subconjuntos de locus se pueden elegir al azar pero con cantidades suficientes para producir un resultado estadísticamente significativo para determinar si existe una anomalía cromosómica. Se pueden realizar múltiples análisis de diferentes subconjuntos de locus dentro de una muestra mixta y en diferentes matrices para producir más potencia estadística. Por ejemplo, si existen 100 locus para el cromosoma 21 y 100 locus para el cromosoma 18, se podrían realizar una serie de análisis que evalúen menos de 100 locus para cada uno de los cromosomas en diferentes matrices. En este ejemplo, las secuencias diana no se excluyen selectivamente.

30 La cantidad de diferentes locus detectables en determinados cromosomas puede variar dependiendo de una serie de factores, incluyendo representación general de locus fetales en muestras maternas, tasas de degradación de los diferentes locus que representan locus fetales en muestras maternas, procedimientos de preparación de muestras y similares.

**Ensayo de ligación en tándem**

35 En determinados aspectos, los procedimientos de la invención emplean procedimientos de ligación en tándem que comprenden el uso de primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija que son complementarios a los locus en una región genómica diana, por ejemplo, un cromosoma de interés o un cromosoma de referencia, y uno o más oligonucleótidos puente cortos (también llamados oligonucleótidos "tablilla" u oligonucleótidos "de hueco" o de "relleno de hueco") complementarios a las regiones de los locus entre e inmediatamente adyacentes a los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija. La hibridación de estos oligonucleótidos entre oligonucleótidos de secuencia fija hibridados en un locus seleccionado, seguido de la ligación de estos oligonucleótidos, proporciona un producto de ligación que a su vez proporciona un molde para la amplificación, si se desea. Un ensayo de ligación en tándem tiende a ser más discriminatorio que el uso de una única sonda oligonucleotídica o el uso de solo dos sondas oligonucleotídicas fijas, ya que la complementariedad perfecta entre la secuencia fija y los oligonucleótidos puente y el locus seleccionado debe existir en ambos sitios de ligación para que se produzca la ligación.

40 En aspectos preferentes, se usa un único oligonucleótido puente que se hibrida de forma adyacente entre los oligonucleótidos de secuencia fija en los procedimientos de unión en tándem. De forma alternativa, en algunos aspectos, los procedimientos de ligación en tándem usan conjuntos de dos oligonucleótidos de secuencia fija con un conjunto de dos o más oligonucleótidos puente que se hibridan de forma adyacente en la región del ácido nucleico entre la región complementaria a los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija. Estos oligonucleótidos puente se hibridan de forma adyacente entre sí y a los oligonucleótidos de secuencia fija. Los dos oligonucleótidos de secuencia fija y los dos oligonucleótidos puente se ligan durante la reacción de ligación, lo que da como resultado un único producto de ligación que sirve como molde para la amplificación y, en última instancia, para la detección.

45 En otros aspectos de la invención, el procedimiento emplea conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija que se unen a regiones no adyacentes dentro de un locus seleccionado, y la extensión del cebador se utiliza para crear un

conjunto contiguo de oligonucleótidos hibridados antes de la etapa de ligación. De forma alternativa, los procedimientos pueden emplear conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija, uno o más oligonucleótidos puente y la extensión de uno o más de los oligonucleótidos hibridados. La combinación de extensión y ligación proporciona un producto de ligación que a su vez sirve como molde para la amplificación, seguido de detección y cuantificación.

5 En un aspecto preferente, los procedimientos de la invención emplean una reacción multiplexada con un conjunto de tres o más oligonucleótidos para cada locus seleccionado. Este aspecto general se ilustra en la FIG. 6 en el que se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 602, 604. Cada conjunto de oligonucleótidos de secuencia fija 602, 604 comprende los primeros oligonucleótidos de secuencia fija 606, 608, comprendiendo cada uno una secuencia complementaria a una región de ácido nucleico de interés 610, 612, una región de unión a marcador 614, 616 y una región de cebador universal 618, 620 y los segundos oligonucleótidos de secuencia fija 622, 624 comprendiendo cada uno una secuencia complementaria a la región de ácido nucleico de interés 626, 628, una región de captura 630, 632 y una región de cebador universal 634, 636. En la etapa 638, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 602, 604 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden específicamente a porciones complementarias de los locus 640, 642 en las regiones genómicas diana. Después de la hibridación, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra genética (no mostrado). La retirada de los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se puede separar de forma alternativa del resto de la muestra genética después de la etapa de ligación a continuación. En la etapa 644, se introducen conjuntos de oligonucleótidos puente 646, 648 y se permite que se hibriden específicamente a la región de los locus entre el primer oligonucleótido de secuencia fija 606, 608 y el segundo oligonucleótido de secuencia fija 622, 624. De forma alternativa, los oligonucleótidos puente 646, 648 se pueden introducir simultáneamente con los oligonucleótidos de secuencia fija.

25 En la etapa 650, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 602, 604 y los oligonucleótidos puente 630, 632 se ligan para crear productos de ligación 652, 654 complementarios a los locus 640, 642. También, en la etapa 650, los cebadores universales 658, 660, 662 y 664 se introducen en los productos de ligación 652, 654 donde los cebadores universales se unen a las regiones de cebadores universales 618, 634, 620 y 636, respectivamente, y amplifican los productos de ligación para crear los amplicones 678, 680 que comprenden las regiones de unión a marcador 666, 668 y las regiones de captura 662, 664. En determinados modos de realización preferentes, los cebadores universales 658 y 662 tienen sustancialmente la misma secuencia, que es complementaria tanto a 618 como a 620, y los cebadores universales 660 y 664 tienen sustancialmente la misma secuencia, que es complementaria tanto a 634 como a 636. Los amplicones 678, 680 se introducen en una matriz de hibridación 670 que comprende una pluralidad de sondas de captura 672 en las que las regiones de captura 662, 664 de los amplicones 658, 660 se hibridan competitivamente a las regiones de captura diana 674 en las sondas de captura 672. 35 En la etapa 676, las regiones de reconocimiento diana 682, 684 de los oligonucleótidos marcados 688, 690 se hibridan específicamente a las regiones de unión a marcador 666, 668 de los amplicones 678, 680. Después de la hibridación de los oligonucleótidos marcados, los oligonucleótidos marcados no hibridados se retiran preferentemente de la matriz (no mostrado). Los marcadores 686, 688 de los oligonucleótidos marcados 688, 690 se pueden detectar a continuación y cuantificar opcionalmente los locus para proporcionar información sobre la presencia y cantidad de cada región genómica en la muestra genética.

40 En determinados aspectos, los oligonucleótidos puente pueden estar compuestos de una mezcla de oligonucleótidos con redundancia en cada una de las posiciones, de modo que la mezcla de oligonucleótidos puente será compatible con todas las reacciones en el ensayo multiplexado que requiere un puente de una longitud dada. En un ejemplo, el oligonucleótido puente es aleatorio, donde se sintetizan todas las combinaciones del oligonucleótido puente. Como ejemplo, en el caso donde se usa un oligonucleótido de 5 bases, el número de oligonucleótidos puente únicos sería  $4^5 = 1024$ . Esto sería independiente del número de regiones dirigidas ya que todos los oligonucleótidos puente posibles estarían presentes en la reacción. En otro aspecto, los oligonucleótidos puente pueden ser de diversas longitudes de modo que la mezcla de oligonucleótidos es compatible con las reacciones de ligación que requieren oligonucleótidos puente de diferentes longitudes.

45 Aún en otro aspecto, el oligonucleótido puente puede tener redundancia en posiciones específicas (es decir, sitios polimórficos conocidos) y las reacciones de ligación en tándem se restringen a aquellas que requieren una secuencia específica proporcionada en el sitio polimórfico.

55 En otro ejemplo, el oligonucleótido puente es específico, sintetizado para que coincida con las secuencias en el hueco. Como ejemplo, en el caso donde se usa un oligonucleótido de 5 bases, el número de oligonucleótidos únicos proporcionados en el ensayo sería igual a o menor que el número de locus. Se podría lograr un número de oligonucleótidos puente menor que el número de locus si la secuencia de hueco se compartiera entre dos o más locus. 60 En un aspecto de este ejemplo, se podrían elegir a propósito los locus y en especial las secuencias de hueco de modo que exista tanta superposición idéntica como sea posible en las secuencias de hueco, minimizando el número de oligonucleótidos puente necesarios para la reacción multiplexada.

65 En otro aspecto, se diseñan las secuencias de los oligonucleótidos puente y se seleccionan los locus de modo que todos los locus compartan la(s) misma(s) base(s) en cada extremo del oligonucleótido puente. Por ejemplo, se podrían elegir locus y su localización de hueco de modo que todos los huecos compartieran una base "A" en la primera posición

y una base "G" en la última posición del hueco. Se podría utilizar cualquier combinación de una primera y última base, en base a factores tales como el genoma investigado, la verosimilitud de variación de secuencia en esa área y similares. En un aspecto específico de este ejemplo, los oligonucleótidos puente se pueden sintetizar por redundancia aleatoria de bases en las posiciones internas del oligonucleótido puente, con nucleótidos específicos en la primera y última posición del oligonucleótido puente. En el caso de un 5-mero, las posiciones segunda, tercera y cuarta serían redundantes, y los dos nucleótidos específicos en el extremo del oligonucleótido puente se fijarían. En este caso, el número de oligonucleótidos puente únicos sería  $4^3 = 64$ .

En el genoma humano, la frecuencia del dinucleótido CG es mucho menor de lo esperado por las respectivas frecuencias mononucleotídicas. Esto presenta una oportunidad para potenciar la especificidad de un ensayo con una mezcla particular de oligonucleótidos puente. En este aspecto, los oligonucleótidos puente se pueden seleccionar para tener una G en 5' y una C en 3'. Esta selección de bases permite que cada oligonucleótido tenga una alta frecuencia en el genoma humano, pero hace que sea raro que dos oligonucleótidos puente se hibriden de forma adyacente entre sí. A continuación, se reduce la probabilidad de que múltiples oligonucleótidos se ligan en localizaciones del genoma que no están dirigidas en el ensayo.

En determinados aspectos, el oligonucleótido puente se añade a la reacción después de que los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija se hayan hibridado, y después de la retirada opcional de todos los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados. Las condiciones de la reacción de hibridación se optimizan preferentemente cerca de la  $T_m$  del oligonucleótido puente para evitar la hibridación errónea de oligonucleótidos que no sean totalmente complementarios a la región de ácido nucleico. Si los oligonucleótidos puente tienen una  $T_m$  significativamente menor que los oligonucleótidos de secuencia fija, el oligonucleótido puente se añade preferentemente como parte de la reacción de ligasa.

La ventaja del uso de oligonucleótidos puente cortos es que la ligación en cualquier extremo se producirá probablemente solo cuando todas las bases del oligonucleótido puente coincidan con la secuencia de hueco. Otra ventaja del uso de oligonucleótidos puente cortos es que el número de oligonucleótidos puente diferentes necesarios podría ser menor que el número de locus, lo que eleva la concentración eficaz de los oligonucleótidos para permitir que las coincidencias perfectas sucedan más rápido. Menos números de oligonucleótidos puente proporcionan las ventajas de ahorro de coste y control de calidad. Las ventajas del uso de las primera y última bases fijas y bases aleatorias intermedias incluyen la capacidad de utilizar oligonucleótidos puente más largos para una mayor especificidad mientras se reduce el número de oligonucleótidos puente totales en la reacción.

### 55 **Detección de polimorfismos**

En determinados aspectos, los procedimientos de la invención detectan una o más regiones genómicas diana que comprenden un polimorfismo. En algunos modos de realización, esta metodología no se diseña necesariamente para identificar un alelo particular, por ejemplo, como materno frente a fetal, sino más bien para garantizar que se incluyan diferentes alelos correspondientes a locus en una región genómica diana en los procedimientos de cuantificación de la invención. Sin embargo, en determinados aspectos, puede ser deseable tanto el uso de información alélica para contar todos los locus en la región genómica diana, así como el uso de la información alélica, por ejemplo, para calcular la cantidad de ADN fetal contenido dentro de una muestra materna, o identificar el porcentaje de alelos con una mutación particular en una muestra genética de un paciente con cáncer. Por tanto, los procedimientos de la invención están destinados a englobar tanto los mecanismos para la detección de locus que contienen SNP para la determinación directa de la variación en el número de copias a través de la cuantificación, así como la detección de SNP para garantizar la eficacia global del ensayo.

Por tanto, en un aspecto particular de la invención, se proporciona discriminación alélica a través de los oligonucleótidos de secuencia fija o a través de los oligonucleótidos puente usados para la detección de los locus. En dichos modos de realización, la región de unión a marcador puede servir como un índice de alelo que se incluye en el primer oligonucleótido de secuencia fija o bien en el segundo oligonucleótido de secuencia fija en un conjunto. En determinados aspectos específicos, un índice de alelo (por ejemplo, región de unión a marcador) está presente tanto en el primer como en el segundo oligonucleótido de secuencia fija para detectar dos o más polimorfismos dentro de los locus. El número de oligonucleótidos de secuencia fija usados en dichos aspectos puede corresponder al número de posibles alelos que se evalúan para un locus seleccionado, y la detección de un marcador asociado con el índice de alelo puede detectar la presencia, cantidad o ausencia de un alelo específico en una muestra genética.

La FIG. 7 ilustra un aspecto de la invención en el que se detectan polimorfismos usando hibridación competitiva a una matriz. En la FIG. 7, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 702, 704 en los que el primer oligonucleótido de secuencia fija 706, 708 de cada conjunto comprende una secuencia que es complementaria a un locus de interés 710, 712 que comprende, por ejemplo, un SNP A/T o G/C, respectivamente y un marcador 714, 716. El segundo oligonucleótido de secuencia fija 722, 724 comprende una secuencia que es complementaria al locus seleccionado 726, 728 y una región de captura 730, 732. En algunos modos de realización, el oligonucleótido de secuencia fija 706 es el mismo que el oligonucleótido de secuencia fija 708 excepto por los SNP 718 y 720 y los marcadores 714 y 716, respectivamente; y el oligonucleótido de secuencia fija 722 es el mismo que el oligonucleótido de secuencia fija 724. Es decir, la diferencia entre los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija es el SNP

interrogado y el marcador que corresponde al SNP. En la etapa 734, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 702, 704 se introducen en la muestra y se permite que se hibriden específicamente al locus de interés 736, 738 que comprende los SNP 740, 742. Después de la hibridación o ligación, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra genética (no mostrado). En la etapa 744, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 702, 704 se ligan para crear los productos de ligación 746, 748. Es importante destacar que en este modo de realización la ligación es específica de alelo siempre que el nucleótido específico de alelo esté cerca del punto de unión de ligación. Típicamente, el nucleótido específico de alelo debe estar dentro de los 5 nucleótidos del extremo ligado; sin embargo, en aspectos preferentes, el nucleótido específico de alelo es la base terminal.

En la etapa 750, los productos de ligación 746, 748 se introducen en una matriz de hibridación 752 que comprende una pluralidad de sondas de captura 754 donde las regiones de captura 730, 732 de los productos de ligación 746, 748 se hibridan a las sondas de captura 754. Después de la hibridación de los productos de ligación, los productos de ligación no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra genética (no mostrado). A continuación se pueden detectar los marcadores 714, 716 y se cuantifican los alelos específicos de los locus correspondientes a cada región genómica diana para proporcionar información sobre la presencia y cantidad de cada alelo y región genómica diana en la muestra genética.

En otro modo de realización, el nucleótido específico de alelo se dispone en los primer y/o segundo oligonucleótidos de secuencia fija y los oligonucleótidos puente se usan para crear productos de ligación. La FIG. 8 ilustra este aspecto de la invención. En la FIG. 8, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 802, 804, donde ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija se configuran para interrogar a diferentes SNP en el mismo locus seleccionado. Los primeros oligonucleótidos de secuencia fija 806, 808 de cada conjunto comprenden una secuencia que es complementaria a un locus seleccionado 810, 812 que comprende por ejemplo un SNP A/T o G/C, respectivamente, una región de unión a marcador 814, 816 y una región de cebador universal 818, 820; y los segundos oligonucleótidos de secuencia fija 826, 828, que comprenden cada uno secuencias que son complementarias para un locus seleccionado 830, 832, la región de captura 834, 836 y las regiones de cebadores universales 838, 840. En los ensayos polimórficos, los segundos oligonucleótidos de secuencia fija 826 y 828 tienen sustancialmente la misma secuencia y los primeros oligonucleótidos de secuencia fija 806, 808 tienen sustancialmente la misma secuencia excepto por el sitio SNP y las regiones de unión a marcador 814, 816. En la etapa 842, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 802, 804 se introducen en la muestra y se permite que se hibriden a los locus 844, 846 que comprenden los SNP 848, 850. Después de la hibridación, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra genética (no mostrado).

En la etapa 852, se introduce un conjunto de oligonucleótidos puente 854, 856 en la muestra y se permite que se hibriden al locus 844, 846 entre los primer y segundo oligonucleótidos fijos de cada conjunto. En un modo de realización preferente, 854 y 856 tienen sustancialmente la misma secuencia. En la etapa 858, los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados y los oligonucleótidos puente hibridados se ligan para crear los productos de ligación 860, 862. En la etapa 864, los cebadores universales 866, 868, 870 y 872 se introducen en los productos de ligación 860, 862 que se unen a las regiones de cebadores universales 818, 838, 820 y 840, respectivamente, y amplifican los productos de ligación 860, 862 para producir los amplicones 874, 876 que comprenden las regiones de unión a marcador 882, 884 y las regiones de captura 878, 880. Los amplicones se introducen en una matriz de hibridación 886 que comprende sondas de captura 888 donde las regiones de captura 878, 880 de los amplicones 874, 876 se hibridan a las sondas de captura 888. En la etapa 892, los oligonucleótidos marcados 894, 895 se introducen en la matriz de hibridación 886 en condiciones que permiten que las regiones de reconocimiento diana 896, 897 de los oligonucleótidos marcados 894, 895 se hibriden selectivamente a las regiones de unión a marcador 882, 884 de los amplicones 874, 876. Después de la hibridación de los oligonucleótidos marcados, los oligonucleótidos marcados no hibridados se retiran preferentemente de la matriz (no mostrado). A continuación se pueden detectar los marcadores 898, 899 y se cuantifican los alelos correspondientes a los locus correspondientes a las regiones genómicas diana para proporcionar información sobre la presencia y cantidad de los alelos en los locus y las regiones genómicas diana en la muestra genética.

En determinados aspectos de la invención, la discriminación alélica se proporciona a través del oligonucleótido puente. En este aspecto, el oligonucleótido puente se localiza sobre un SNP, preferentemente se localiza lo suficientemente cerca de un extremo de un punto de unión de ligación para proporcionar especificidad alélica.

En un ejemplo, ambas variantes de oligonucleótidos puente de alelos están presentes en la misma mezcla de reacción y la detección de alelos resulta de la posterior hibridación de marcadores asociados a matrices de hibridación. La FIG. 9 ilustra este aspecto.

En la FIG. 9, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 902, 904 donde ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija se configuran para interrogar al mismo locus seleccionado y son iguales excepto por la región de unión a marcador. En este modo de realización, el oligonucleótido puente interroga al SNP, y el ensayo se debe realizar en dos recipientes separados al menos hasta que haya tenido lugar la etapa de ligación. Los primeros oligonucleótidos de secuencia fija 906, 908 en cada conjunto comprenden secuencias que son complementarias a un locus 910, 912, una región de captura 914, 916 y una región de cebador universal 918, 920. Los segundos

oligonucleótidos de secuencia fija 922, 924 de cada conjunto comprenden secuencias que son complementarias al locus 926, 928, una región de unión a marcador 930, 932 y una región de cebador universal 934, 936. En la etapa 938, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 902, 904 se introducen en la muestra en condiciones que permiten que cada conjunto 902, 904 se hibride específicamente al locus 940, 942 en el que el locus seleccionado comprende un SNP 944, 946. Después de la hibridación (o de forma alternativa después de la ligación) de los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija, los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra genética (no mostrado). En la etapa 948, se introducen los oligonucleótidos puente 950, 952 correspondientes a un SNP A/T o un SNP G/C y se permite que se unan a la región del locus 940, 942 entre los primer y segundo oligonucleótidos de secuencia fija. De forma alternativa, los oligonucleótidos puente se pueden introducir en la muestra simultáneamente con los oligonucleótidos de secuencia fija.

En la etapa 954, los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados y los oligonucleótidos puente se ligan para crear productos de ligación 956, 958. En este punto, los dos ensayos separados se pueden combinar opcionalmente en un único recipiente, pero no es necesario. En la etapa 960, los cebadores de amplificación universal 962, 964, 966 y 968 se introducen en los productos de ligación 956, 958 donde los cebadores universales se unen a las regiones de cebadores universales 918, 934, 920 y 936, respectivamente, y amplifican los productos de ligación 956, 958 para producir los amplicones 970, 972, comprendiendo cada uno una región de unión a marcador 980, 982 y una región de captura 974, 976. Los amplicones 970, 972 se introducen en una matriz de hibridación 984 que comprende una pluralidad de sondas de captura 986 en las que las regiones de captura 974, 976 de los amplicones 970, 972 se hibridan competitivamente a las sondas de captura 986. En la etapa 990, los oligonucleótidos marcados 992, 994 se introducen en la matriz 984 donde las regiones de reconocimiento diana 996, 997 de los oligonucleótidos marcados 992, 994 se hibridan a las regiones de unión a marcador 980, 982 de los amplicones 970, 972. Después de la hibridación de los oligonucleótidos marcados, los oligonucleótidos marcados no hibridados se retiran preferentemente de la matriz (no mostrado). A continuación se pueden detectar los marcadores 998, 999 y se cuantifican los alelos correspondientes a los locus correspondientes a su vez a las regiones genómicas diana para proporcionar información sobre la presencia y cantidad de cada alelo y región genómica diana en la muestra.

#### Modos de realización adicionales

La FIG. 10 es una ilustración de otro modo de realización específico de la invención en el que se usan oligonucleótidos puente y los productos de ligación se escinden doblemente antes de la hibridación a una matriz. En el procedimiento representado en la FIG. 10, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1002, 1004. Cada conjunto comprende un primer oligonucleótido de secuencia fija 1006, 1008 que comprende las secuencias complementarias a los locus 1010, 1012, las regiones de unión a marcador 1018, 1020, las regiones de captura 1014, 1016, las regiones de cebadores universales 1022, 1024 y las regiones del sitio de reconocimiento de enzima de restricción 1026, 1028. Las regiones de unión a marcador 1018, 1020 comprenden secuencias que son diferentes para los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1002, 1004 para permitir el marcaje diferencial de oligonucleótidos de secuencia fija asociados con cada región genómica diana diferente, mientras que las regiones de captura 1014, 1016 en este modo de realización son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1002, 1004 para permitir la hibridación competitiva a las casillas de captura de una matriz de hibridación. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1026, 1028 pueden ser los mismos para ambos sitios de escisión en cada oligonucleótido de secuencia fija, y/o los mismos para los diferentes conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1002, 1004 dependiendo del modo de realización. También existe un segundo oligonucleótido de secuencia fija 1030, 1032 en cada conjunto, donde cada segundo oligonucleótido de secuencia fija comprende una secuencia complementaria a los locus 1034, 1036 y una región de cebador universal 1038, 1040.

En la etapa 1042, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1002, 1004 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden a los locus 1044, 1046. Después de la hibridación (o de forma alternativa la ligación), los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra (no mostrado). En la etapa 1048, se añade un oligonucleótido puente 1026, 1028 a cada conjunto y se hibrida de forma adyacente entre los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados. En la etapa 1054, los conjuntos de oligonucleótidos se ligan para crear productos de ligación 1050, 1052. En la etapa 1054, los cebadores universales 1056, 1058, 1060 y 1062 se introducen en los productos de ligación 1050, 1052 que se unen a las regiones de cebadores universales 1022, 1038, 1024 y 1040, respectivamente, para crear los amplicones 1064, 1066 que comprenden las regiones de unión a marcador 1018, 1020, las regiones de captura 1014, 1016 y los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1072, 1074, 1076 y 1078. En la etapa 1070, se introducen una o más enzimas de restricción en los amplicones 1064, 1066 y los amplicones se escinden doblemente para crear un amplicón escindido que comprende las regiones de unión a marcador 1018, 1020 y las regiones de captura 1014, 1016. Los productos escindidos se introducen en una matriz de hibridación 1086 que comprende una pluralidad de sondas de captura 1088 donde las regiones de captura 1014, 1016 de los amplicones escindidos se hibridan competitivamente a las sondas de captura 1090. Las regiones de captura hibridadas a continuación se introducen 1088 en los oligonucleótidos marcados 1082, 1084, que se unen a secuencias complementarias en los productos escindidos y se detectan.

La FIG. 11 es una ilustración de otro modo de realización específico de la invención en el que se usan oligonucleótidos puente para identificar diferentes alelos en el mismo locus y los productos de ligación se escinden doblemente antes de la hibridación a una matriz. En el procedimiento representado en la FIG. 11, se proporcionan dos conjuntos de

oligonucleótidos de secuencia fija 1102, 1104 para un único locus que tiene un posible polimorfismo. Cada conjunto comprende un primer oligonucleótido de secuencia fija 1106, 1108 que comprende las secuencias complementarias a un alelo del locus seleccionado 1110, 1112, las regiones de unión a marcador 1118, 1120, las regiones de captura 1114, 1116, las regiones de cebadores universales 1122, 1124 y las regiones del sitio de reconocimiento de enzima de restricción 1126, 1128. Las regiones de unión a marcador 1118, 1120 comprenden secuencias que son diferentes para los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1102, 1104 para permitir el marcaje diferencial de oligonucleótidos de secuencia fija asociados con cada alelo diferente, mientras que las regiones de captura 1114, 1116 en este modo de realización son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1102, 1104 para permitir la hibridación competitiva a las casillas de captura de una matriz de hibridación. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1126, 1128 pueden ser los mismos para ambos sitios de escisión en cada oligonucleótido de secuencia fija, y/o los mismos para los diferentes conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1102, 1104 dependiendo del modo de realización. También existe un segundo oligonucleótido de secuencia fija 1130, 1132 en cada conjunto, donde cada segundo oligonucleótido de secuencia fija comprende una secuencia complementaria al locus seleccionado 1134, 1136 y una región de cebador universal 1138, 1140.

En la etapa 1142, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1102, 1104 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden al locus seleccionado 1144, 1146. Después de la hibridación (o de forma alternativa la ligación), los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra (no mostrado). En la etapa 1148, se añade un oligonucleótido puente 1126, 1128 a cada conjunto y se hibrida de forma adyacente entre los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados. En la etapa 1154, los conjuntos de oligonucleótidos se ligan para crear productos de ligación 1150, 1152. En la etapa 1154, los cebadores universales 1156, 1158, 1160 y 1162 se introducen en los productos de ligación 1150, 1152 que se unen a las regiones de cebadores universales 1122, 1138, 1124 y 1140, respectivamente, para crear los amplicones 1164, 1166 que comprenden las regiones de unión a marcador 1118, 1120, las regiones de captura 1114, 1116 y los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1172, 1174, 1176 y 1178. En la etapa 1170, se introducen una o más enzimas de restricción en los amplicones 1164, 1166 y los amplicones se escinden doblemente para crear un amplicón escindido que comprende las regiones de unión a marcador 1118, 1120 y las regiones de captura 1114, 1116. Los productos escindidos se introducen en una matriz de hibridación 1186 que comprende una pluralidad de sondas de captura 1188 donde las regiones de captura 1118, 1120 de los amplicones escindidos se hibridan competitivamente a las sondas de captura 1190. Las regiones de captura hibridadas a continuación se introducen 1188 en los oligonucleótidos marcados 1182, 1184, que se unen a secuencias complementarias en los productos escindidos y se detectan para diferenciar entre los diferentes alelos del locus.

La FIG. 12 es una ilustración de otro modo de realización específico de la invención en el que se usan oligonucleótidos puente y los productos de ligación se escinden antes de la hibridación a una matriz. En este modo de realización, los cebadores usados para amplificar los productos de ligación se marcan diferencialmente. En el procedimiento representado en la FIG. 12, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1202, 1204. Cada conjunto comprende un primer oligonucleótido de secuencia fija 1206, 1208 que comprende las secuencias complementarias a los locus 1210, 1212, las regiones de unión a cebador 1218, 1224 (que son diferentes), las regiones de captura 1214, 1220 y las regiones del sitio de reconocimiento de enzima de restricción 1226, 1228. Las regiones de unión a cebador 1218, 1224 comprenden secuencias que son diferentes para los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1202, 1204 para permitir el marcaje diferencial de oligonucleótidos de secuencia fija asociados con cada región genómica diana diferente, mientras que las regiones de captura 1214, 1220 en este modo de realización son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1202, 1204 para permitir la hibridación competitiva a las casillas de captura de una matriz de hibridación. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1226, 1228 pueden ser los mismos para ambos sitios de escisión en cada oligonucleótido de secuencia fija, y/o los mismos para los diferentes conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1302, 1304 dependiendo del modo de realización. También existe un segundo oligonucleótido de secuencia fija 1230, 1232 en cada conjunto, donde cada segundo oligonucleótido de secuencia fija comprende una secuencia complementaria a los locus 1234, 1236 y una región de cebador 1238, 1240.

En la etapa 1242, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1202, 1204 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden a los locus 1244, 1246. Después de la hibridación (o de forma alternativa la ligación), los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra (no mostrado). En la etapa 1248, se añade un oligonucleótido puente 1226, 1228 a cada conjunto y se hibrida de forma adyacente entre los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados. En la etapa 1254, los conjuntos de oligonucleótidos se ligan para crear productos de ligación 1250, 1252. En la etapa 1254, los cebadores 1256, 1258, 1260 y 1262 se introducen en los productos de ligación 1250, 1252 que se unen a las regiones de cebadores 1218, 1238, 1224 y 1240, respectivamente, para crear los amplicones 1264, 1266 que comprenden las regiones de unión a cebador 1278, 1284, las regiones de captura 1276, 1280 y los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1272 y 1274. Los cebadores 1256 y 1260 se marcan diferencialmente, permitiendo por tanto la diferenciación entre los amplicones de los diferentes locus una vez que los amplicones se hibridan a una matriz. En la etapa 1270, se introducen una o más enzimas de restricción en los amplicones 1264, 1266 y los amplicones se escinden para crear un amplicón escindido que comprende las regiones de unión a cebador 1278, 1284 y las regiones de captura 1276, 1280. Los productos escindidos se introducen en una matriz de hibridación 1286 en la etapa 1290 que comprende una pluralidad de sondas

de captura 1288 donde las regiones de captura 1276, 1280 de los amplicones escindidos se hibridan competitivamente a las sondas de captura 1288.

La FIG. 13 es una ilustración de otro modo de realización específico de la invención en la que se usan oligonucleótidos puente y los productos de ligación se escinden antes de la hibridación a una matriz. La FIG. 13 ilustra un modo de realización muy similar al de la fig. 12. En este modo de realización, los cebadores usados para amplificar los productos de ligación se marcan diferencialmente. En el procedimiento representado en la FIG. 13, se proporcionan dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1302, 1304. Cada conjunto comprende un primer oligonucleótido de secuencia fija 1306, 1308 que comprende las secuencias complementarias a los locus 1310, 1312, las regiones de unión a cebador 1318, 1324 (que son diferentes), las regiones de captura 1314, 1320 (que son iguales) y las regiones del sitio de reconocimiento de enzima de restricción 1326, 1328. Las regiones de unión a cebador 1318, 1324 comprenden secuencias que son diferentes para los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1302, 1304 para permitir el marcaje diferencial de oligonucleótidos de secuencia fija asociados con cada región genómica diana diferente, mientras que las regiones de captura 1314, 1320 en este modo de realización son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1302, 1304 para permitir la hibridación competitiva a las casillas de captura de una matriz de hibridación. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1326, 1328 pueden ser los mismos para ambos sitios de escisión en cada oligonucleótido de secuencia fija, y/o los mismos para los diferentes conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1302, 1304 dependiendo del modo de realización. También existe un segundo oligonucleótido de secuencia fija 1330, 1332 en cada conjunto, donde cada segundo oligonucleótido de secuencia fija comprende una secuencia complementaria a los locus 1334, 1326 y una región de cebador 1338, 1340.

En la etapa 1342, los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija 1302, 1304 se introducen en una muestra y se permite que se hibriden a los locus 1344, 1346. Después de la hibridación (o de forma alternativa la ligación), los oligonucleótidos de secuencia fija no hibridados se separan preferentemente del resto de la muestra (no mostrado). En la etapa 1348, se añade un oligonucleótido puente 1326, 1328 a cada conjunto y se hibrida de forma adyacente entre los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados. En la etapa 1354, los conjuntos de oligonucleótidos se ligan para crear productos de ligación 1350, 1352. En la etapa 1354, los cebadores 1356, 1358, 1360 y 1362 se introducen en los productos de ligación 1350, 1352 que se unen a las regiones de cebadores 1318, 1338, 1324 y 1340, respectivamente, para crear los amplicones 1364, 1366 que comprenden las regiones de unión a cebador 1378, 1384, las regiones de captura 1376, 1380 y los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 1372 y 1374. Los cebadores 1356 y 1360 se marcan diferencialmente, permitiendo por tanto la diferenciación entre los amplicones de los diferentes locus una vez que los amplicones se hibridan a una matriz. En la etapa 1370, se introducen una o más enzimas de restricción en los amplicones 1364, 1366 y los amplicones se escinden para crear un amplicón escindido que comprende las regiones de unión a cebador 1378, 1384 y las regiones de captura 1376, 1380. Los productos escindidos se introducen en una matriz de hibridación 1386 en la etapa 1390 que comprende una pluralidad de sondas de captura 1388 donde las regiones de captura 1376, 1380 de los amplicones escindidos se hibridan competitivamente a las sondas de captura 1388.

En los modos de realización de las FIGS. 10-13, los amplicones de escisión introducidos en la matriz no incluyen ninguna porción de la región genómica diana o una secuencia complementaria de la misma. Las regiones de captura se usan en asociación con diferentes regiones genómicas diana, y el oligonucleótido marcado se usa para diferenciar entre regiones. De esta manera, los amplicones escindidos se hibridan competitivamente a sondas de captura comunes, y la cuantificación de las regiones genómicas diana se determina por los marcadores detectados correspondientes a los productos escindidos que se unen a la matriz.

Como se describe previamente, los modos de realización de la presente invención mostrados en las figuras 2-13 representan dos oligonucleótidos de secuencia fija separados usados para interrogar a cada locus o alelo. Sin embargo, en algunos aspectos, sin embargo, se puede usar una única sonda que comprende dos o más oligonucleótidos de secuencia fija no adyacentes distintos que son complementarios a los locus incluyendo sondas precirculares. Dichas sondas precirculares se describen, por ejemplo, por Lizardi en las patentes de EE. UU. n.º 5.854.033 y 6.316.229, y se pueden linealizar antes de la hibridación a la matriz incluyendo, por ejemplo, un sitio para una endonucleasa de restricción en la sonda.

### **Amplificación universal**

En determinados aspectos de la invención, se usa amplificación universal para amplificar los productos de ligación después de la hibridación y ligación de los oligonucleótidos de secuencia fija, directamente o bien después de la extensión o la introducción de un oligonucleótido puente. En un sistema de ensayo multiplexado, la amplificación se realiza preferentemente a través de amplificación universal usando cebadores universales que se hibridan a regiones de cebadores universales en el primer y segundo oligonucleótido de secuencia fija de cada conjunto. Las regiones de cebadores universales de los oligonucleótidos de secuencia fija se convierten en parte de los productos de ligación, donde los productos de ligación se pueden amplificar a continuación en una única reacción de amplificación universal. Aunque estas secuencias de cebadores universales se introducen preferentemente por medio de los oligonucleótidos de secuencia fija, también se pueden añadir a los extremos proximales de los productos de ligación por medio de ligación. La introducción de regiones de cebadores universales en los oligonucleótidos de secuencia fija permite una posterior amplificación universal controlada de todos o una porción de los productos de ligación antes de la hibridación

de la matriz. El amplicón producido a partir de este proceso de amplificación se puede usar directamente o procesarse adicionalmente antes de la introducción en la matriz para la detección. En modos de realización específicos, el amplicón se escinde, y la porción que comprende la región de captura se introduce en la matriz para hibridación y detección. El sesgo y la variabilidad se pueden introducir durante la amplificación de ADN, tal como lo observado durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En casos donde una reacción de amplificación se multiplexa, existe el potencial de que los locus se amplifiquen a diferentes tasas o eficacia. Los conjuntos de cebadores para un locus dado se pueden comportar de forma diferente en base al contexto de secuencia del cebador y el ADN molde, las condiciones del tampón y otras condiciones. En determinados aspectos, las regiones de cebadores universales usadas en los procedimientos se diseñan para ser compatibles con los procedimientos de ensayo multiplexado convencionales que utilizan mecanismos de cebado generales para analizar grandes cantidades de ácidos nucleicos simultáneamente. Dichos procedimientos de cebado "universales" permiten un análisis eficaz y de alto volumen de la cantidad de regiones de ácido nucleico presentes en una muestra genética, y permiten una cuantificación exhaustiva de la presencia de regiones de ácido nucleico dentro de una muestra de este tipo.

Se puede usar la totalidad de una reacción de ligación o una alícuota de la reacción de ligación para la amplificación universal. El uso de una alícuota permite que se lleven a cabo reacciones de amplificación paralelas usando las mismas condiciones o diferentes (por ejemplo, polimerasa, tampones y similares), por ejemplo, para garantizar que no se introduzca involuntariamente el sesgo debido a las condiciones experimentales. Además, se pueden usar variaciones en las concentraciones de cebadores para limitar eficazmente el número de ciclos de amplificación específicos de secuencia. Los ejemplos de procedimientos de ensayo de multiplexación incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Oliphant *et al.*, patente de EE. UU. n.º 7.582.420.

Como se describe en detalle en el presente documento, muchos procedimientos de la invención utilizan reacciones acopladas para la detección multiplexada donde los oligonucleótidos de una fase temprana del proceso de múltiples etapas contienen secuencias que se pueden usar en una fase posterior del proceso. Se pueden usar procesos conocidos en la técnica para amplificar y/o detectar ácidos nucleicos en muestras, solos o en combinación, incluyendo, pero sin limitarse a, los procedimientos descritos a continuación. En determinados aspectos, los procedimientos de la invención utilizan una de las siguientes técnicas de amplificación selectiva y universal combinadas: (1) LDR acoplada a PCR; (2) PCR primaria acoplada a PCR secundaria acoplada a LDR; y (3) PCR primaria acoplada a PCR secundaria. Cada una de estas combinaciones de técnicas puede utilizar regiones de sonda de una fase temprana en el proceso que se pueden usar como secuencia de cebador en una fase posterior del proceso.

Barany *et al.*, patentes de EE. UU. n.º 6.852.487, 6.797.470, 6.576.453, 6.534.293, 6.506.594, 6.312.892, 6.268.148, 6.054.564, 6.027.889, 5.830.711, 5.494.810, describen el uso del ensayo de reacción en cadena de la ligasa (LCR) para la detección de secuencias específicas de nucleótidos en una variedad de muestras de ácido nucleico.

Barany *et al.*, patentes de EE. UU. n.º 7.807.431, 7.455.965, 7.429.453, 7.364.858, 7.358.048, 7.332.285, 7.320.865, 7.312.039, 7.244.831, 7.198.894, 7.166.434, 7.097.980, 7.083.917, 7.014.994, 6.949.370, 6.852.487, 6.797.470, 6.576.453, 6.534.293, 6.506.594, 6.312.892 y 6.268.148 describen el uso de la reacción de detección de la ligasa con reacción de detección ("LDR") acoplada con la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") para la detección de ácido nucleico.

Barany *et al.*, patentes de EE. UU. n.º 7.556.924 y 6.858.412, describen el uso de sondas de candado (también llamadas "sondas precirculares" o "sondas de inversión múltiple") con la reacción de detección de la ligasa ("LDR") acoplada y la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") para la detección de ácido nucleico.

Barany *et al.*, patentes de EE. UU. n.º 7.807.431, 7.709.201 y 7.198.814 describen el uso de reacciones combinadas de escisión y ligación de endonucleasas para la detección de secuencias del ácido nucleico.

Willis *et al.*, patentes de EE. UU. n.º 7.700.323 y 6.858.412, describen el uso de sondas precirculares en la amplificación, detección y genotipado de ácido nucleico multiplexado.

Ronaghi *et al.*, patente de EE. UU. n.º 7.622.281 describe técnicas de amplificación para marcar y amplificar un ácido nucleico usando un adaptador que comprende un cebador único y un código de barras.

Las regiones de ácido nucleico de interés se identifican usando técnicas de hibridación y matrices. Los procedimientos para realizar ensayos de hibridación de polinucleótidos para la detección están bien desarrollados y son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos y condiciones de ensayo de hibridación variarán dependiendo de la aplicación y se seleccionan de acuerdo con los procedimientos de unión generales conocidos incluyendo los mencionados en: Maniatis *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger y Kimmel Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); Young y Davis, P.N.A.S., 80: 1194 (1983). Los procedimientos y aparatos para llevar a cabo reacciones de hibridación repetidas y controladas se han descrito en las patentes de EE. UU. n.º 5.871.928, 5.874.219, 6.045.996 y 6.386.749, 6.391.623.

En algunos modos de realización, las matrices comprenden múltiples sustratos en solución, tales como los enseñados, por ejemplo, en la solicitud de EE. UU. n.º 20140057269 y la solicitud de EE. UU. n.º 20140042366 y la solicitud de EE. UU. n.º 20140024550.

5 La presente invención también contempla la detección de señal de hibridación entre ligandos en determinados aspectos preferentes. Véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.143.854, 5.578.832; 5.631.734; 5.834.758; 5.936.324; 5.981.956; 6.025.601; 6.141.096; 6.185.030; 6.201.639; 6.218.803; y 6.225.625, en la solicitud de patente de EE. UU. 60/364.731 y en la solicitud PCT PCT/US99/06097 (publicada como documento WO99/47964).

10 Los procedimientos y aparatos para la detección de señales y el procesamiento de datos de intensidad se divulgan, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.143.854, 5.547.839, 5.578.832, 5.631.734, 5.800.992, 5.834.758; 5.856.092, 5.902.723, 5.936.324, 5.981.956, 6.025.601, 6.090.555, 6.141.096, 6.185.030, 6.201.639; 6.218.803; y 6.225.625, en la solicitud de patente de EE. UU. 60/364.731 y en la solicitud PCT PCT/US99/06097 (publicada como documento WO99/47964).

15 En determinados aspectos, la región de captura de los productos de ligación de una única muestra o los amplicones de los mismos contienen secuencias de índice que identifican los productos de ligación como de una muestra particular. Las casillas de la matriz comprenderán sondas de captura que incluyen secuencias complementarias a las secuencias de índice de las diferentes muestras para permitir la identificación de los locus de una muestra particular a partir de la que se originaron los locus.

#### **Estimación de la proporción de ADN fetal en una muestra materna**

25 Se puede usar la proporción de ADN fetal en una muestra materna como parte del cálculo de riesgo de la presente invención, ya que la proporción fetal proporciona información importante sobre la presencia estadística esperada de la dosificación cromosómica. La variación de la presencia estadística esperada puede ser indicativa de aneuploidía fetal, y en particular una trisomía o monosomía fetal de un cromosoma particular.

30 Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para estimar el porcentaje de ADN fetal en una muestra materna, incluyendo cuantificar las secuencias Y si el feto es masculino o mirar los marcadores epigenéticos (véase, por ejemplo, Chim, *et al.*, PNAS USA, 102:14753-58 (2005)). El uso de la proporción fetal como un componente del cálculo de riesgo es particularmente útil en circunstancias donde el nivel de ADN fetal en una muestra materna es bajo. Además, se puede usar el conocimiento del porcentaje de ADN fetal para determinar que si se puede realizar cualquier análisis adicional en la muestra, como puede ser el caso en un determinado límite inferior del porcentaje de ADN fetal, un sistema no puede realizar un análisis de forma fiable. En otros aspectos, determinar la proporción de ADN fetal en una muestra materna puede afectar adicionalmente al nivel de certeza o potencia en la detección de una aneuploidía fetal.

40 Aunque se describen los siguientes procedimientos 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 locus en los cromosomas 1 y 2. En determinados aspectos, el cromosoma usado para determinar la proporción fetal es el cromosoma interrogado por una posible aneuploidía. En otro aspecto, el/los cromosoma(s) usado(s) para determinar la proporción fetal específicamente no es/son el cromosoma interrogado por una posible aneuploidía.

50 El ADN de un feto tendrá aproximadamente un 50 % de sus locus heredados de la madre y aproximadamente un 50 % de sus locus heredados del padre. Determinar qué locus genéticos se aportan al feto a partir de fuentes no maternas (locus 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 dosificaciones cromosómicas para los cromosomas de interés.

55 En determinados aspectos, la determinación de polimorfismos no maternos se logra a través de un análisis de SNP y/o mutación dirigido para estimar el porcentaje de ADN fetal en una muestra materna, un proceso que es particularmente adaptable al análisis de matriz de la presente invención. El porcentaje de ADN sin células fetales en una muestra materna se puede cuantificar usando detección de SNP multiplexada sin conocimiento previo del genotipo materno o paterno. En este aspecto, se usan dos o más regiones de ácido nucleico polimórficas seleccionadas con un SNP conocido en cada región. En un aspecto preferente, las regiones de ácido nucleico polimórficas seleccionadas se localizan en un cromosoma autosómico que es poco probable que sea aneuploide, por ejemplo, ni los cromosomas 21, 18 ni 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, y en un modo de realización preferente, las regiones de ácido nucleico polimórficas seleccionadas se amplifican en una reacción en un recipiente con los productos de ligación de los oligonucleótidos de secuencia fija usados para determinar una aneuploidía cromosómica. Cada alelo de las regiones de ácido nucleico polimórficas

seleccionadas en la muestra materna se determina y se cuantifica. En un aspecto preferente, se usa secuenciación de alto rendimiento para dicha determinación y cuantificación.

Por tanto, se identifican los locus donde los genotipos maternos y no maternos son diferentes; por ejemplo, el genotipo materno es homocigótico y el genotipo no materno es heterocigótico. Esta identificación de locus informativos se logra observando una alta frecuencia de un alelo (>80 %) y una baja frecuencia (<20 % y >0,15 %) del otro alelo para una región de ácido nucleico seleccionada particular. El uso de múltiples locus es particularmente ventajoso ya que reduce la cantidad de variación en la medición de la abundancia de los alelos entre locus. Se usan todos o un subconjunto de los locus que cumplen con este requisito para determinar la contribución fetal a través de análisis estadístico. En un aspecto, la contribución fetal se determina sumando los alelos de baja frecuencia de dos o más locus juntos, dividiendo entre la suma de los alelos de baja y alta frecuencia y multiplicando por dos.

Para muchos alelos, las secuencias maternas y no maternas pueden ser homocigóticas e idénticas, y como esta información por lo tanto no distingue entre ADN materno y no materno, no es útil en la determinación del porcentaje de ADN fetal en una muestra materna. La presente invención utiliza información alélica donde existe una diferencia distinguible entre el ADN no materno 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. Por tanto, los datos pertenecientes a regiones alélicas que son iguales para el ADN materno y no materno no se seleccionan para el análisis, o se retiran de los datos pertinentes antes de la estimación de la proporción de ADN fetal para no ocultar 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).

#### **Análisis de datos**

Una vez que se ha calculado el porcentaje de ADN sin células fetales, estos datos se pueden combinar con procedimientos para la detección de aneuploidía para determinar la verosimilitud de que un feto pueda contener una aneuploidía. En un aspecto, se usa un procedimiento de detección de aneuploidía que utiliza el análisis de segmentos de ADN aleatorios, tal como el descrito en, por ejemplo, Quake, USSN 11/701.686; y Shoemaker *et al.*, USSN n.º 12/230.628. En un aspecto preferente, se usan procedimientos de detección de aneuploidía que utilizan análisis de regiones de ácido nucleico seleccionadas. En este aspecto, se calcula el porcentaje de ADN sin células fetales para una muestra. Se determina la proporción cromosómica para esa muestra, una proporción cromosómica para la población normal y una variación para la proporción cromosómica para la población normal, como se describe en el presente documento. De forma alternativa, la proporción cromosómica calculada usa una expectativa para una muestra cromosómicamente normal y una expectativa para una muestra aneuploide. La proporción cromosómica calculada para una muestra se compara a continuación con esas expectativas.

En un aspecto preferente, la proporción cromosómica y su variación para la población normal se determinan a partir de muestras normales que tienen un porcentaje similar de ADN fetal. Se calcula una proporción cromosómica aneuploide esperada para una muestra de ADN con ese porcentaje de ADN sin células fetales añadiendo el porcentaje de contribución del cromosoma aneuploide. A continuación se puede comparar la proporción cromosómica para la muestra con la proporción cromosómica para la población normal y con la proporción cromosómica aneuploide esperada para determinar estadísticamente, usando la variación de la proporción cromosómica, si la muestra es más probable que sea normal o aneuploide, y la probabilidad estadística de que sea una u otra.

En un aspecto preferente, las regiones seleccionadas de una muestra materna incluyen tanto regiones para la estimación del contenido en ADN fetal, así como regiones no polimórficas de dos o más cromosomas para detectar una aneuploidía fetal en una única reacción. La única reacción ayuda a minimizar el riesgo de contaminación o sesgo que se puede introducir durante las diversas etapas en el sistema de ensayo que de otro modo puede desviar los resultados cuando se utiliza el contenido en ADN fetal para ayudar a determinar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

En otros aspectos, una región o regiones de ácido nucleico seleccionadas se pueden utilizar tanto para la estimación del contenido en ADN fetal así como para la detección de anomalías cromosómicas fetales. Los alelos para regiones de ácido nucleico seleccionadas se pueden usar para estimar el contenido en ADN fetal y estas mismas regiones de ácido nucleico seleccionadas se pueden usar a continuación para detectar anomalías cromosómicas fetales ignorando la información alélica. La utilización de las mismas regiones de ácido nucleico seleccionadas tanto para el contenido en ADN fetal como para la detección de anomalías cromosómicas puede ayudar además a minimizar cualquier sesgo debido a error experimental o contaminación.

En un modo de realización, la contribución de la fuente fetal en una muestra materna independientemente del género fetal se mide usando SNP autosómicos (véase, Sparks, *et al.*, *Am. J. Obstet & Gyn.*, 206:319.e1-9 (2012)). Los procesos utilizados no requieren conocimiento previo del genotipo paterno, ya que los alelos no maternos se identifican durante los procedimientos independientemente de la herencia paterna. Se puede usar una estimación de verosimilitud máxima usando la distribución binomial para calcular la contribución estimada de ácido nucleico fetal a través de varios locus informativos en cada muestra materna. Los procesos para el cálculo de la contribución de ácido fetal usados se describen, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. n.º 2013/0024127. Las regiones polimórficas

usadas para la determinación de la contribución fetal pueden ser de los cromosomas 1-12, y preferentemente no se dirigen a los antígenos del grupo sanguíneo. La estimación de la contribución fetal de los ensayos polimórficos se usa para definir las magnitudes de respuesta esperadas cuando un cromosoma de prueba es trisómico, lo que fundamenta las pruebas estadísticas. El estadístico de prueba puede consistir en dos componentes: una medida de desviación de la proporción esperada cuando la muestra es disómica; y una medida de desviación de la proporción esperada cuando la muestra es trisómica. Cada componente tiene la forma de un estadístico de Wald (por ejemplo, Harrell, Regression modeling strategies, (2001, Springer-Verlag), secciones 9.2.2 y 10.5) que compara una proporción observada con una proporción esperada y se divide entre la variación de la observación.

El estadístico  $W_j$  se puede usar para medir la desviación de la expectativa cuando la muestra  $j$  es disómica y se define como

$$W_j = \frac{p_j - p_0}{\sigma_{p_j}}$$

donde  $p_j$  y  $p_0$  se definen como se describe arriba con el estadístico  $Z$ , y  $\sigma_{p_j}$  es la desviación estándar de la proporción observada de representación para un cromosoma de interés dado. La desviación estándar se puede estimar usando un muestreo *bootstrap* paramétrico para crear una distribución de proporciones de  $p_j$  basada en los recuentos medios y los errores estándar para los cromosomas de interés del presente estudio. El segundo estadístico es  $\hat{W}_j$  que reemplaza  $p_0$  con la proporción de referencia ajustada de fracción fetal  $\hat{p}_j$  se define como

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

donde  $f_j$  es la fracción fetal para la muestra  $j$  y  $p_0$  es la proporción de referencia como antes. Este ajuste explica el incremento en la representación de un cromosoma de prueba cuando el feto era trisómico. Debido a que esta variación de recuentos en muchos locus se mide como un resultado natural del uso de múltiples ensayos no polimórficos para los cromosomas de prueba, todas las estimaciones se toman dentro de un conjunto de datos naciente y no requieren muestras de referencia externas o información histórica con ajustes de normalización para controlar la deriva del proceso, como se requiere típicamente para la varianza alrededor de la proporción esperada.

El estadístico final usado fue  $S_j = W_j + \hat{W}_j$ . Conceptualmente, las desviaciones de la expectativa disómica y la expectativa trisómica se evalúan simultáneamente y se resumen en este estadístico único. La ventaja particular de combinar estos dos indicadores es que, aunque la desviación de la disomía podría ser alta, puede que no alcance la desviación esperada para la trisomía en un nivel de contribución fetal particular. El componente  $\hat{W}_j$  será negativo en este caso, penalizando en efecto la desviación de la disomía. Un  $S_j = 0$  indicó la misma posibilidad de ser disómico frente a trisómico.

### Implementación informática de los procesos de la invención

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

La salida del componente informático comprende un informe con un valor de probabilidad de que una región genómica y/o un cromosoma tenga una anomalía de dosificación. En un aspecto preferente, este informe es una razón de posibilidades de un valor de la verosimilitud de que una región o cromosoma tenga dos copias (por ejemplo, sea disómico) y un valor de la verosimilitud de que una región o cromosoma tenga más copias (por ejemplo, sea trisómico) o menos copias (por ejemplo, sea monosómico). El informe puede ser papel impreso, o electrónico, que se puede mostrar en un monitor y/o comunicarse electrónicamente a los usuarios por medio de correo electrónico, FTP, mensaje de texto, publicado en un servidor, y similares.

Aunque el proceso de normalización de la invención se muestra como implementado como programa informático, también se puede implementar como una combinación de soporte físico y programa informático. Además, el programa informático para la normalización se puede implementar como múltiples componentes funcionando en el mismo o en diferentes ordenadores.

Tanto el servidor como el ordenador pueden incluir componentes de soporte físico de dispositivos informáticos típicos, 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 y el ordenador 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 informáticas que implementan la funcionalidad divulgada

cuando se ejecutan por el procesador. El servidor y el ordenador pueden incluir además interfaces de comunicación de red cableada o inalámbrica para la comunicación.

### Ejemplos

5 Los ejemplos siguientes se proponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y una descripción completas de cómo preparar y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni están destinados a representar o implicar que los experimentos a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Por lo tanto, los aspectos actuales se deben considerar en todos los  
10 respectos como ilustrativos y no restrictivos.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la  
15 temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

#### Ejemplo 1: sujetos

Se analizaron un total de 878 muestras de sangre venosa materna con la siguiente clasificación del estado de trisomía: 20 691 eran disómicas, 18 eran trisomía 13, 37 eran trisomía 18 y 132 eran trisomía 21. Se obtuvieron las muestras de sangre de mujeres embarazadas de al menos 18 años de edad con embarazos únicos a las 10-34 semanas de gestación. La clasificación de trisomía se había determinado previamente para todas las muestras sometidas a prueba; se sometieron a prueba originalmente 486 muestras usando la prueba prenatal Harmony de Ariosa Diagnostics, Inc. (San José, CA), y se obtuvieron 396 muestras de pacientes que se sometieron a cariotipado de diagnóstico amniótico  
25 o bien a examen posnatal de recién nacidos seguido de cariotipado cuando se sospechaba una trisomía.

#### Ejemplo 2: preparación de muestra

La preparación y el análisis de muestra se realizaron como se describe en Sparks, *et al.*, Am J. Obstet Gynecol., 30 207(5):374.e1-6 (2012). Se purificó el ADN sin células del plasma de cada paciente y se prepararon los productos de ensayo DANSR™ (análisis digital de regiones seleccionadas) (por ejemplo, productos de ligación en tándem) a partir de locus en los cromosomas 13, 18 y 21. Para este análisis, se usaron ensayos de ligación usando conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija y oligonucleótidos puente correspondientes a 864 regiones genómicas en cada uno de los cromosomas 13, 18 y 21. Se unió la muestra de ADN a un soporte sólido y se retiraron los oligonucleótidos no  
35 hibridados antes de la ligación. Además, se desarrollaron ensayos de ligación usando conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija y oligonucleótidos puente correspondientes a 576 sitios polimórficos en los cromosomas 1 a 12 para evaluar la fracción de ADNcf fetal en cada muestra. Se amplificó una porción del producto del ensayo de ligación producido a partir de cada muestra usando cebadores universales y se secuenció, y la porción restante del producto del ensayo de ligación se hibridó a una matriz de ADN fabricada personalizada. Antes de la hibridación, se escindieron los amplicones. Estas porciones contenían productos idénticos.

#### Ejemplo 3: cuantificación del producto de ligación usando matrices

Se fabricaron matrices de ADN personalizadas por Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) para cuantificar específicamente 45 los productos del ensayo DANSR. Se formaron imágenes de matrices de ADN en un instrumento Affymetrix GeneTitan® Multi-Channel (MC). Se sometió a ensayo cada muestra de paciente en una única matriz de ADN personalizada. Se fabricaron matrices de ADN y se procesaron en conjuntos interconectados de 384. Se produjeron datos de secuenciación de próxima generación en un Illumina HiSeq® 2500 (San Diego, CA). Se generaron grupos en una Illumina Cluster Station usando los reactivos TruSeq™ Cluster Generation (San Diego, CA). Se obtuvieron en  
50 promedio 1104 recuentos de secuenciación por ensayo.

#### Ejemplo 4: análisis de datos

Se usó un algoritmo publicado previamente titulado Fetal-Fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation (FORTE™) 55 para asignar puntuaciones de riesgo (véase, por ejemplo, Sparks, *et al.*, Am J. Obstet Gynecol., 207(5):374.e1-6(2012)). Se usaron ensayos de ligación no polimórfica en los cromosomas 13, 18 y 21 para determinar la proporción cromosómica para cada uno de estos cromosomas. Se usaron ensayos de ligación polimórfica para determinar la fracción fetal. Se definió la variabilidad de ensayo como el coeficiente de variación (CV) de los recuentos de secuencia (secuenciación) o las intensidades (matrices de ADN) de un ensayo a través de muestras; es preferente una  
60 variabilidad de ensayo menor. La variabilidad de fracción fetal se define como el error estándar relativo de la fracción fetal medida.

#### Ejemplo 5: resultados

65 Para las 878 muestras de plasma sometidas a ensayo para determinar el riesgo de trisomía, existió concordancia completa entre las puntuaciones de riesgo basado en matriz y el estado de trisomía usando los ensayos de ligación y

la detección por hibridación. Por el contrario, la concordancia entre puntuaciones de riesgo basado en secuencia y el estado de trisomía fue de un 99,6 %. La secuenciación informó de puntuaciones de alto riesgo para dos muestras que habían recibido puntuaciones de bajo riesgo en una pantalla NIPT previa. Estos datos demuestran que las puntuaciones de riesgo de trisomía se obtuvieron con exactitud a partir del análisis basado en matriz.

Además, los datos de matriz disminuyen la variabilidad de ensayo en aproximadamente dos veces. Se potenció la exactitud, medida disminuyendo la variabilidad de ensayo, para el análisis de hibridación basado en matriz en comparación con el análisis basado en secuenciación. La mediana de la variabilidad de ensayo para la detección de secuencia de matriz mostró una mejora de casi dos veces sobre la detección basada en secuenciación de próxima generación (0,051 frente a 0,099; valor  $p < 0,0001$ ) (véase la FIG. 14). Las barras del histograma muestran el número de ensayos de ligación (eje y) que comparten un intervalo específico de variabilidad de ensayo (eje x). Los datos de matriz se trazan en gris oscuro, los datos de secuenciación se trazan en blanco. Cuando las dos poblaciones de datos se superponen, las barras son de color gris claro. Los productos de ligación cuantificados basados en matriz tienen una variabilidad de ensayo significativamente menor, donde una variabilidad de ensayo menor es mejor.

Se pueden utilizar matrices para reducir la variabilidad de fracción fetal: la fracción de ADN fetal en plasma afecta a la exactitud de la prueba. Los procedimientos de la presente invención miden, informan y aprovechan la fracción fetal usando el algoritmo FORTE para proporcionar resultados altamente sensibles con una tasa baja de falsos positivos (Sparks, *et al.*, *Am J Obstet Gynecol.*, 206(4):319.e1-9 (2012)). Las fracciones fetales calculadas con FORTE son sumamente reproducibles entre los datos de análisis basados en matriz y en secuenciación ( $R^2 > 0,99$ ). Debido a que la matriz puede medir simultáneamente un mayor número de ensayos de ligación que la secuenciación multiplexada, las estimaciones de fracción fetal que usan análisis basado en matriz son más precisas con una mediana de error estándar relativo de 0,013 en comparación con 0,021.

Los datos presentados en los ejemplos muestran que dos fuentes clave de variabilidad de datos son menores para las matrices en comparación con la secuenciación de próxima generación: 1) variación de la fracción fetal medida usando ensayos polimórficos (variabilidad de fracción fetal) y 2) la variación de ensayos no polimórficos entre muestras (variabilidad de ensayo). Al incluir más ensayos polimórficos, se ha diseñado una prueba prenatal de productos de ligación basada en matriz que proporciona una variabilidad de fracción fetal menor dando como resultado una mejor precisión. Al reducir la variabilidad de ensayo, se pueden medir cambios de aneuploidía más pequeños, tales como los cambios más pequeños observados en muestras de fracción fetal baja. Los datos demuestran que la plataforma de matriz puede realizar una evaluación de aneuploidía fiable. Además, la formación de imágenes de matriz es un proceso rápido y el tiempo de obtención para la cuantificación de muestra se reduce a menos de un minuto por muestra. El sistema de detección específico empleado en estos ejemplos (instrumento GENETITAN™ Multi-Channel) puede formar imágenes de >90 matrices por hora de máquina. Por el contrario, incluso cuando las muestras se multiplexan en grupos de 96 muestras por línea, el sistema de secuenciación HISEQ™ 2500 tiene un rendimiento de 15 muestras por hora de máquina. Esta disminución en el tiempo de máquina y la complejidad se traduce directamente en reducciones en los costes de capital cuando se usa la detección de secuencia de matriz.

El análisis basado en secuencia aprovecha la multiplexación de muestras para lograr un uso económicamente eficaz de la capacidad de secuencia disponible. Sin embargo, sin normalización, una única muestra puede consumir la mayoría de las lecturas de secuencia en una celda de flujo, reduciendo las lecturas disponibles para determinar el riesgo de trisomía en las muestras restantes. Para multiplexar muestras con exactitud, se requieren procesos laboriosos y caros para normalizar las cantidades de ADN de entrada. Incluso cuando se realizan esfuerzos para igualar la entrada de muestra, como se informó en un estudio reciente, se observó una variación de cuatro veces en la mediana de las lecturas por muestra para una reacción 12-plex (Jensen, *et al.*, *PLoS ONE*, 8(3):e57381 (julio 2014)). Los enfoques NIPT basados en matriz no requieren multiplexación de muestras. En cambio, cada muestra se hibrida individualmente en una única matriz. El rendimiento de procesamiento se potencia conectando físicamente, por ejemplo, 384 matrices sobre una única placa de múltiples matrices para un manejo de alto rendimiento conveniente. Debido a que cada muestra se maneja individualmente, se ahorra tiempo y se reduce el coste.

Aunque la presente invención se cumple por los aspectos en muchas formas diferentes, como se describe en detalle en relación con los aspectos preferentes de la invención, se entiende que la presente divulgación se debe considerar como ejemplar de los principios de la invención y no está destinada a limitar la invención a los aspectos específicos ilustrados y descritos en el presente documento. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para diferenciar entre alelos de un locus en una muestra, en el que la muestra es una muestra materna que comprende ADN tanto materno como fetal,
- 5 introduciendo en la muestra dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija,
- en el que los dos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija se proporcionan para un único locus que tiene un posible polimorfismo, en el que cada conjunto comprende:
- 10 (i) un primer oligonucleótido de secuencia fija que comprende
- una secuencia complementaria a un alelo del locus, una región de unión a marcador, una región de captura, una región de cebador universal y dos sitios de reconocimiento de enzima de restricción,
- 15 en el que las regiones de unión a marcador comprenden secuencias que son diferentes para los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija para permitir el marcaje diferencial de oligonucleótidos de secuencia fija asociados con cada alelo diferente, y
- 20 en el que las regiones de captura son las mismas para ambos conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija para permitir la hibridación competitiva a las casillas de captura de una matriz de hibridación; y
- (ii) un segundo oligonucleótido de secuencia fija que comprende una secuencia
- 25 complementaria al locus seleccionado y una región de cebador universal;
- permitiendo que los conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija se hibriden al locus;
- añadiendo un oligonucleótido puente a cada conjunto e hibridando de forma adyacente entre los oligonucleótidos de
- 30 secuencia fija hibridados;
- ligando los oligonucleótidos para crear productos de ligación;
- introduciendo cebadores universales a los productos de ligación, que los cebadores universales unen a las regiones
- 35 de cebadores universales, para crear amplicones que comprenden regiones de unión a marcador, regiones de captura y sitios de reconocimiento de enzima de restricción;
- introduciendo una o más enzimas de restricción en los amplicones y escindiendo doblemente los amplicones en los
- 40 sitios de reconocimiento de enzima de restricción para crear amplicones escindidos, comprendiendo cada uno una región de unión a marcador y una región de captura;
- introduciendo los amplicones escindidos en una matriz de hibridación que comprende una pluralidad de sondas de
- 45 captura donde las regiones de captura de los amplicones escindidos se hibridan competitivamente a sondas de captura;
- introduciendo los amplicones escindidos hibridados en oligonucleótidos marcados que se unen a secuencias
- complementarias en los amplicones escindidos;
- 50 detectando los oligonucleótidos marcados para diferenciar entre los diferentes alelos del locus.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los sitios de reconocimiento de enzima de restricción son los mismos para ambos sitios de escisión en cada oligonucleótido de secuencia fija, y/o los mismos para los diferentes conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija.
- 55 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los productos de ligación se identifican usando una sonda de captura que es complementaria a una región de captura introducida en o al producto de ligación pero que no identifica la región genómica diana a la que corresponde el producto de ligación únicamente por hibridación a una casilla complementaria a la región genómica diana.
- 60 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que
- la cuantificación de los marcadores unidos a las sondas de captura se usa para estimar los niveles o cantidades de productos de ligación, que se usa para estimar la frecuencia del alelo.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la frecuencia alélica se usa para calcular el porcentaje de ácidos nucleicos fetales presentes en una muestra, que es una muestra de suero materno que comprende ADN tanto materno como fetal.
- 5 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además
- interrogar locus de dos o más regiones genómicas usando al menos dos oligonucleótidos de secuencia fija para cada locus interrogado,
- 10 en el que los productos de ligación de diferentes locus en una región genómica seleccionada comprenden regiones de captura de ácido nucleico diseñadas para incluir una región complementaria a una o más sondas de captura en un soporte sólido, y
- 15 en el que la identificación de productos de ligación de diferentes regiones genómicas diana se logra por la unión de las regiones de captura de los productos de ligación a sondas de captura complementarias en el soporte sólido.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, que es un procedimiento para determinar una presencia o ausencia de una aneuploidía,
- 20 en el que las regiones genómicas son cromosomas o regiones subcromosómicas, y
- en el que una diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias relativas de los marcadores en la matriz es indicativa de la presencia o ausencia de una aneuploidía cromosómica en la muestra mixta.
- 25 8. Un procedimiento para proporcionar una verosimilitud estadística de una variación en el número de copias fetales que comprende:
- proporcionar una muestra materna que comprende ADN sin células maternas y fetales;
- 30 interrogar al menos 48 locus no polimórficos de una primera región genómica diana usando primeros conjuntos de al menos dos oligonucleótidos de secuencia fija que comprenden una región complementaria a un locus en la primera región genómica diana en el que uno de los oligonucleótidos de secuencia fija comprende una región de captura, una primera región de unión a marcador y dos sitios de restricción;
- 35 interrogar al menos 48 locus no polimórficos de una segunda región genómica diana usando segundos conjuntos de al menos dos oligonucleótidos de secuencia fija que comprenden una región complementaria a un locus en la segunda región genómica diana en el que uno de los oligonucleótidos de secuencia fija comprende una región de captura, una segunda región de unión a marcador y dos sitios de restricción;
- 40 ligar los oligonucleótidos de secuencia fija;
- amplificar los oligonucleótidos de secuencia fija ligados para crear amplicones;
- 45 escindir los amplicones para crear amplicones escindidos usando una enzima de restricción para escindir en los sitios de restricción dejando la región de unión a marcador y la región de captura disponibles para hibridación y detección;
- detectar los amplicones escindidos de las primera y segunda regiones genómicas diana por medio de hibridación de las regiones de captura de los amplicones escindidos a una matriz que comprende sondas de captura complementarias a las regiones de captura, en el que los amplicones escindidos de las primera y segunda regiones genómicas diana se hibridan competitivamente a las sondas de captura complementarias a las regiones de captura;
- 50 cuantificar las regiones de captura de los amplicones escindidos para determinar una frecuencia relativa de los locus no polimórficos interrogados de las primera y segunda regiones genómicas diana detectando las primera y segunda regiones de unión a marcador;
- 55 estimar la frecuencia relativa de las primera y segunda regiones genómicas diana en base a la frecuencia relativa de las primera y segunda regiones de unión a marcador;
- 60 interrogar al menos 48 locus polimórficos de al menos una región genómica diana diferente de las primera y segunda regiones genómicas diana usando terceros conjuntos de al menos tres oligonucleótidos de secuencia fija para cada locus polimórfico, en el que uno de los al menos tres oligonucleótidos comprende una secuencia complementaria a un alelo en un locus polimórfico, una región de captura específica para cada locus polimórfico, una región de unión a marcador diferente para cada alelo en el locus polimórfico y dos sitios de restricción;
- 65 ligar los oligonucleótidos de secuencia fija específicos de los locus polimórficos;

- amplificar los oligonucleótidos de secuencia fija ligados específicos de los locus polimórficos para crear amplicones;
- 5 escindir los amplicones específicos de los locus polimórficos para crear amplicones escindidos usando una enzima de restricción para escindir en los sitios de restricción dejando la región de unión a marcador y la región de captura disponibles para hibridación y detección;
- 10 detectar amplicones escindidos de los locus polimórficos por medio de hibridación competitiva de las regiones de captura de los amplicones escindidos a sondas de captura en la matriz;
- 15 cuantificar los alelos de los locus polimórficos detectando las diferentes regiones de unión a marcador para cada alelo en los amplicones escindidos para determinar la fracción de ADN fetal en la muestra;
- determinar la fracción de ADN fetal de los alelos cuantificados; y
- calcular una verosimilitud estadística de una variación en el número de copias fetales en la muestra materna usando la frecuencia relativa estimada de las primera y segunda regiones genómicas en la muestra y la fracción de ADN fetal.
9. Un procedimiento para determinar una verosimilitud de una aneuploidía fetal que comprende las etapas de:
- 20 proporcionar una muestra materna que comprende ADN sin células maternas y fetales;
- 25 introducir al menos cincuenta primeros conjuntos de dos o más oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a un conjunto de locus no polimórficos en una primera región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a los locus no polimórficos, en el que al menos uno de los oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal, una región de captura, una primera región de unión a marcador y dos sitios de restricción;
- 30 introducir al menos cincuenta segundos conjuntos de dos o más oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a un conjunto de locus no polimórficos en una segunda región genómica diana en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a los locus no polimórficos, en el que al menos uno de los oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal, una región de captura, una segunda región de unión a marcador y dos sitios de restricción;
- 35 introducir dos o más terceros conjuntos de tres o más oligonucleótidos de secuencia fija complementarios a un conjunto de locus polimórficos en la muestra materna en condiciones que permiten que una región complementaria de cada oligonucleótido de secuencia fija se hibride específicamente a un locus polimórfico, en el que al menos uno de los tres oligonucleótidos de secuencia fija de cada conjunto comprende un sitio de cebador universal, una secuencia complementaria a un alelo en el locus polimórfico, una región de unión a marcador diferente para cada alelo en el locus polimórfico, dos sitios de restricción y una región de captura, en el que la región de captura para cada locus polimórfico es diferente de la región de captura para cada otro locus polimórfico y diferente de las regiones de captura de los primer y segundo conjuntos;
- 40 hibridar los primer, segundo y tercer conjuntos de oligonucleótidos de secuencia fija a las primera y segunda regiones genómicas diana y locus polimórficos;
- 45 extender al menos uno de los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados de los primer, segundo y tercer conjuntos para formar oligonucleótidos de secuencia fija hibridados de forma adyacente;
- 50 ligar los oligonucleótidos de secuencia fija hibridados de forma adyacente de los primer, segundo y tercer conjuntos para crear productos de ligación;
- 55 amplificar los productos de ligación usando los sitios de cebadores universales para crear amplicones;
- escindir los amplicones para crear amplicones escindidos usando una enzima de restricción para escindir en los sitios de restricción dejando la región de unión a marcador y la región de captura disponibles para hibridación y detección;
- 60 aplicar los amplicones escindidos a una matriz, en el que la matriz comprende sondas de captura complementarias a las regiones de captura en los amplicones escindidos de las primera y segunda regiones genómicas diana, y en el que la matriz comprende sondas de captura complementarias a las regiones de captura en los amplicones escindidos de cada locus polimórfico;
- 65 hibridar las regiones de captura de los amplicones escindidos de las primera y segunda regiones genómicas diana a sondas de captura en la matriz;

hibridar las regiones de captura de los amplicones escindidos de los locus polimórficos a sondas de captura en la matriz;

5 detectar los amplicones escindidos hibridados;

cuantificar una frecuencia relativa de cada alelo de los locus polimórficos detectando las diferentes regiones de unión a marcador para cada alelo en los amplicones escindidos para determinar un porcentaje de ADN sin células fetales;

10 determinar el porcentaje sin células fetales;

cuantificar una frecuencia relativa de amplicones escindidos correspondientes a los locus de la primera región genómica diana y una frecuencia relativa de amplicones escindidos correspondientes a los locus de la segunda región genómica diana detectando las primera y segunda regiones de unión a marcador; y

15 computar una verosimilitud de una aneuploidía fetal usando la frecuencia relativa de amplicones escindidos correspondientes a los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana y el porcentaje de ADN sin células fetales.

20 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además:

identificar alelos de baja frecuencia de los alelos cuantificados de los locus polimórficos donde el ADN materno es homocigótico y el ADN fetal es heterocigótico; y usar los alelos de baja frecuencia de los locus polimórficos para determinar la fracción de ADN fetal.

25 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un procedimiento de ensayo para determinar una verosimilitud de una aneuploidía fetal, que comprende además comparar las frecuencias relativas de los amplicones escindidos correspondientes a los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana y ajustar la verosimilitud de una aneuploidía fetal en base al porcentaje de ADN sin células fetales.

35 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que se suman las frecuencias relativas de los amplicones escindidos correspondientes a los locus de la primera región genómica diana y se suman las frecuencias relativas de los amplicones escindidos correspondientes a los locus de la segunda región genómica diana, y la suma de los amplicones escindidos correspondientes a los locus de la primera región genómica diana se compara con la suma de los amplicones escindidos correspondientes a los locus de la segunda región genómica diana para calcular una proporción de región genómica diana.

40 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que al menos dos oligonucleótidos de secuencia fija de cada tercer conjunto comprenden un sitio de cebador universal y una secuencia complementaria al locus polimórfico.

45 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los amplicones escindidos de los locus de las primera y segunda regiones genómicas diana y los amplicones escindidos de los locus polimórficos se amplifican en un único recipiente.

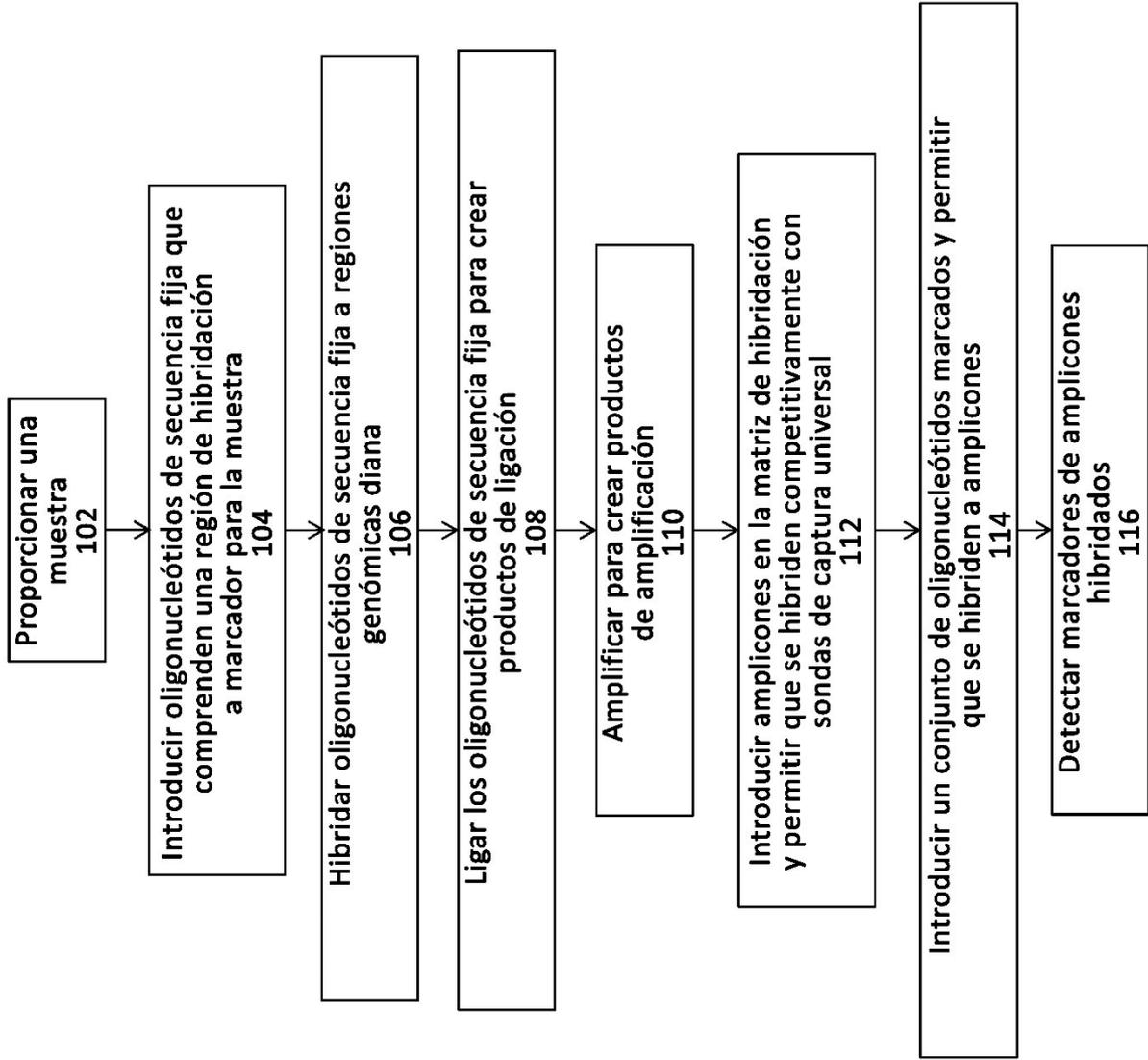


FIG. 1

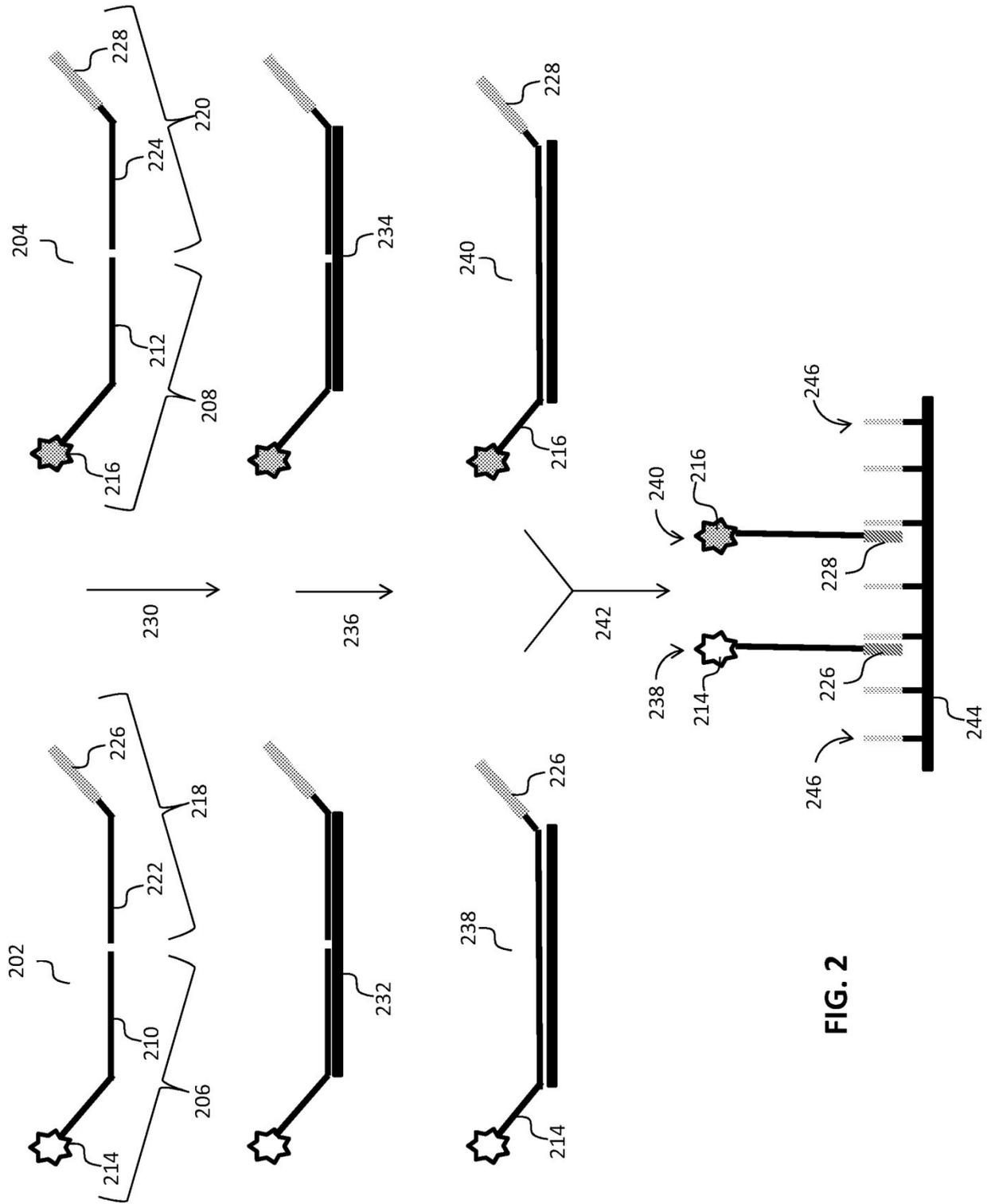


FIG. 2

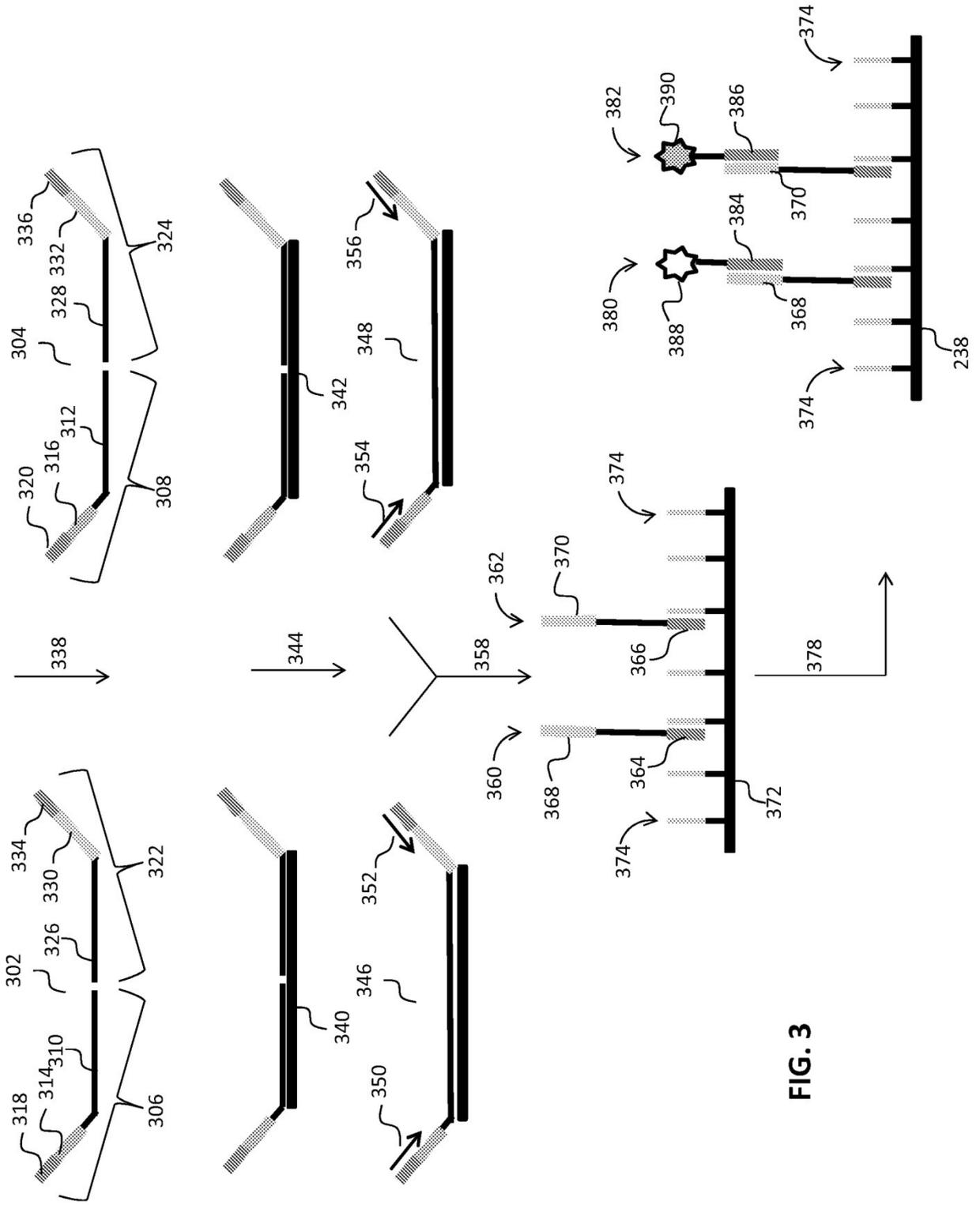


FIG. 3

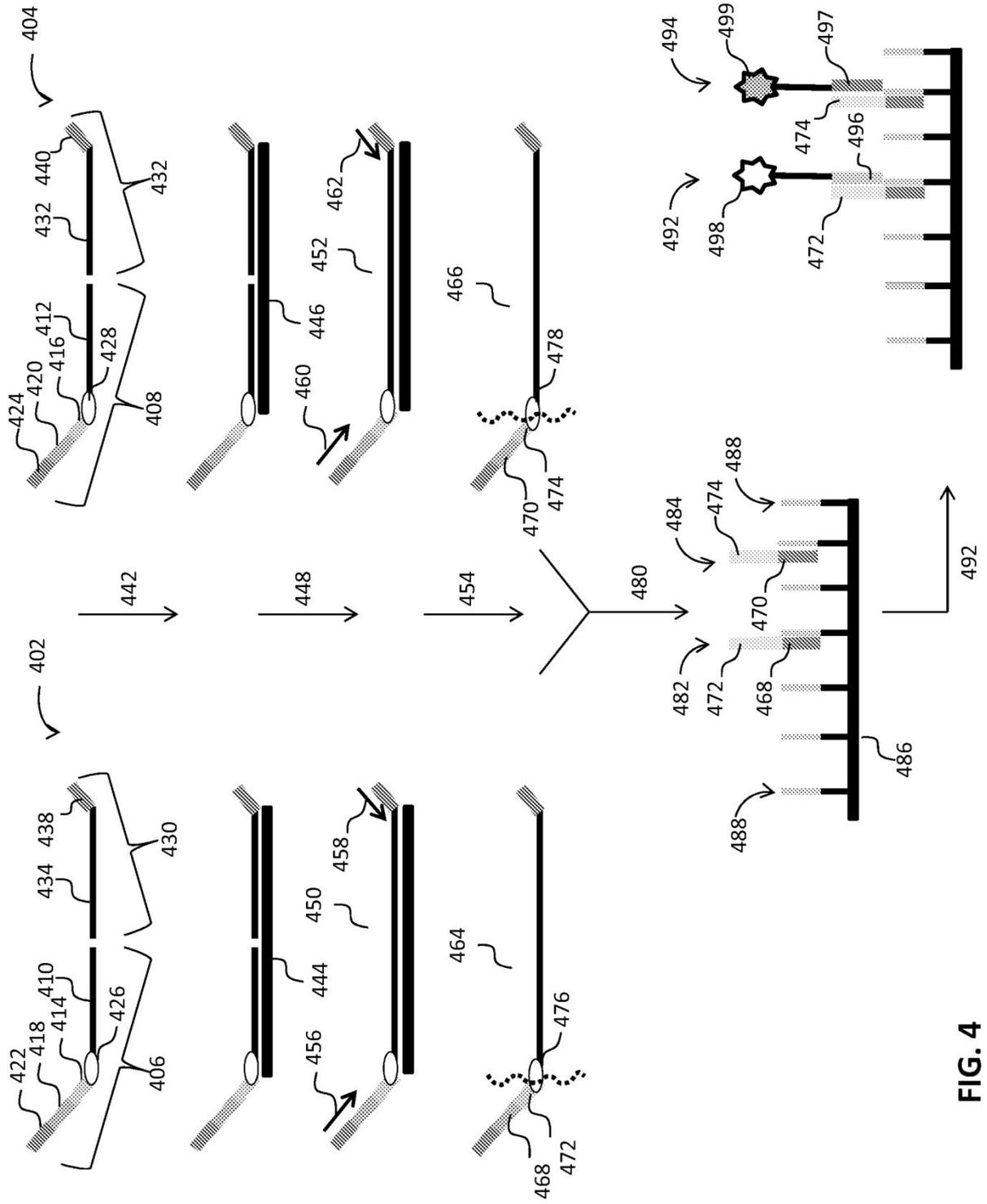


FIG. 4

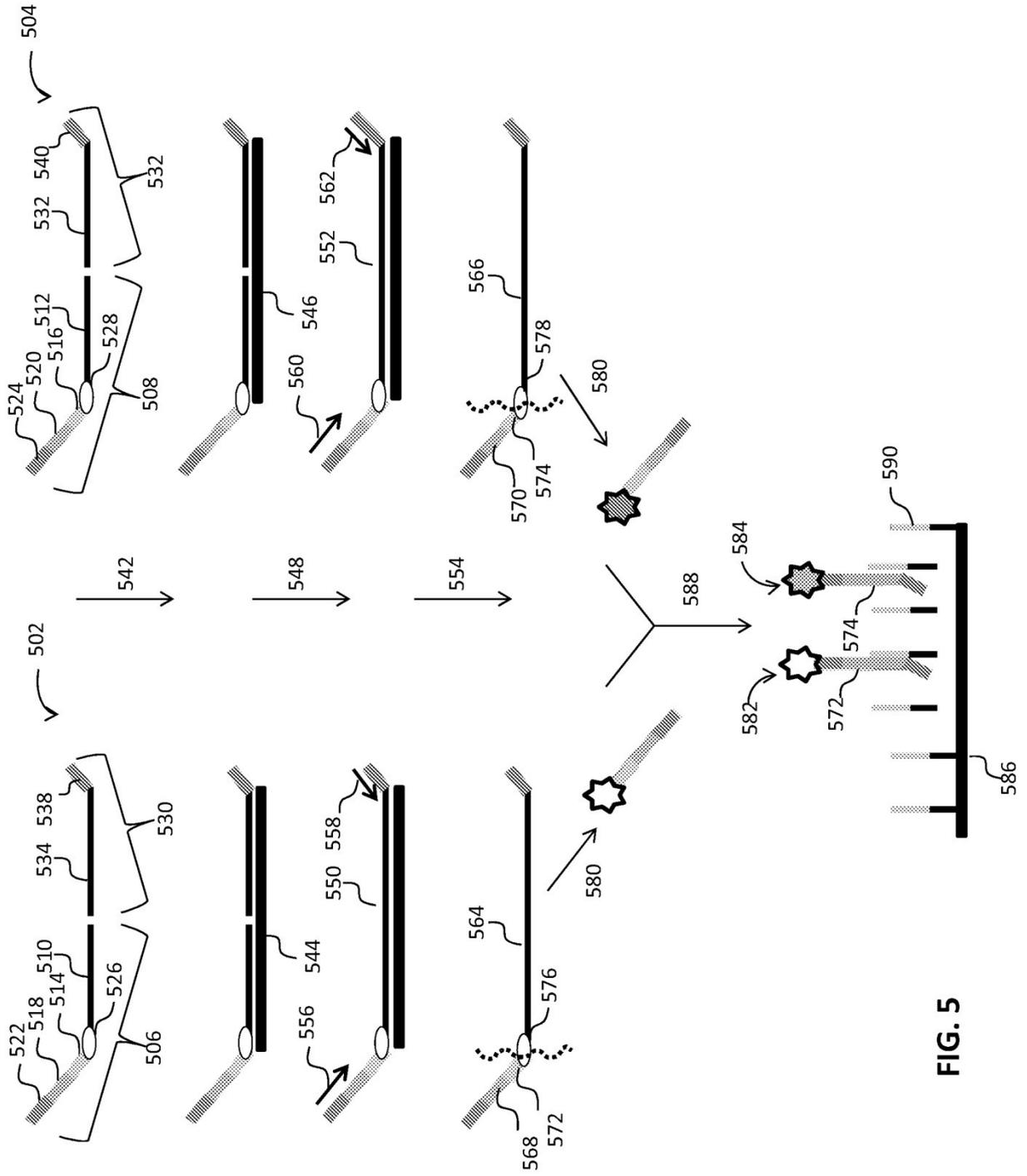


FIG. 5

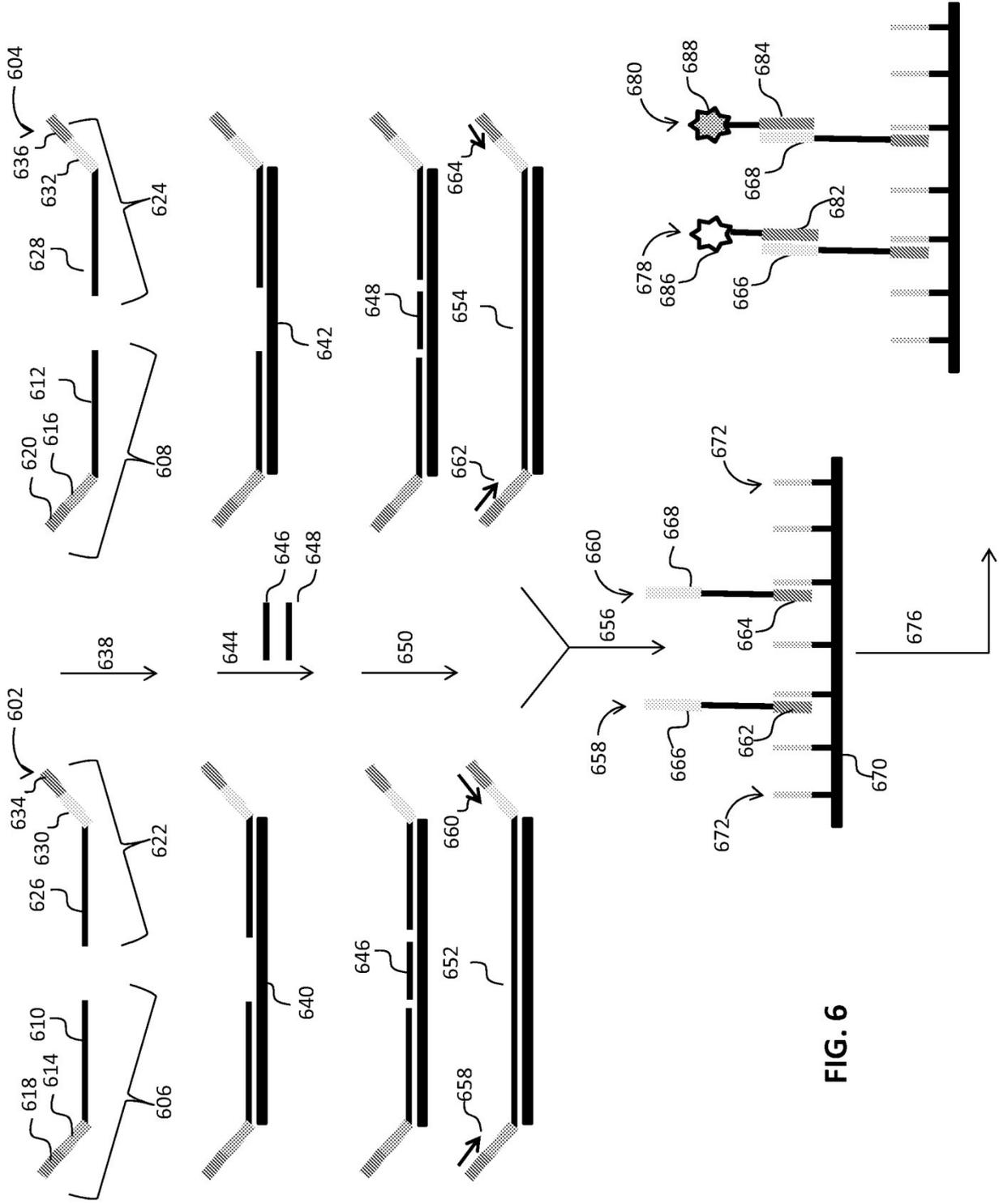


FIG. 6

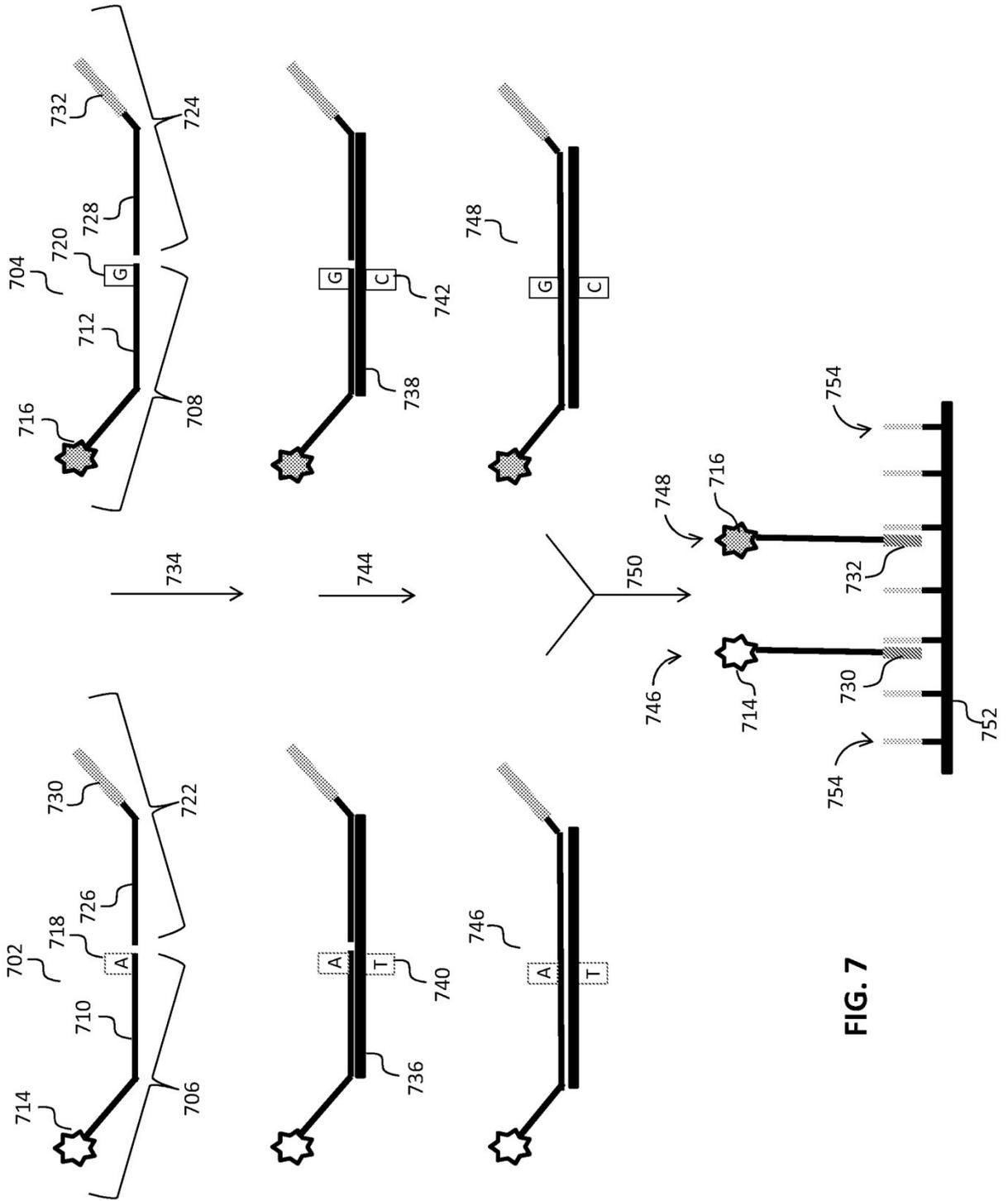


FIG. 7

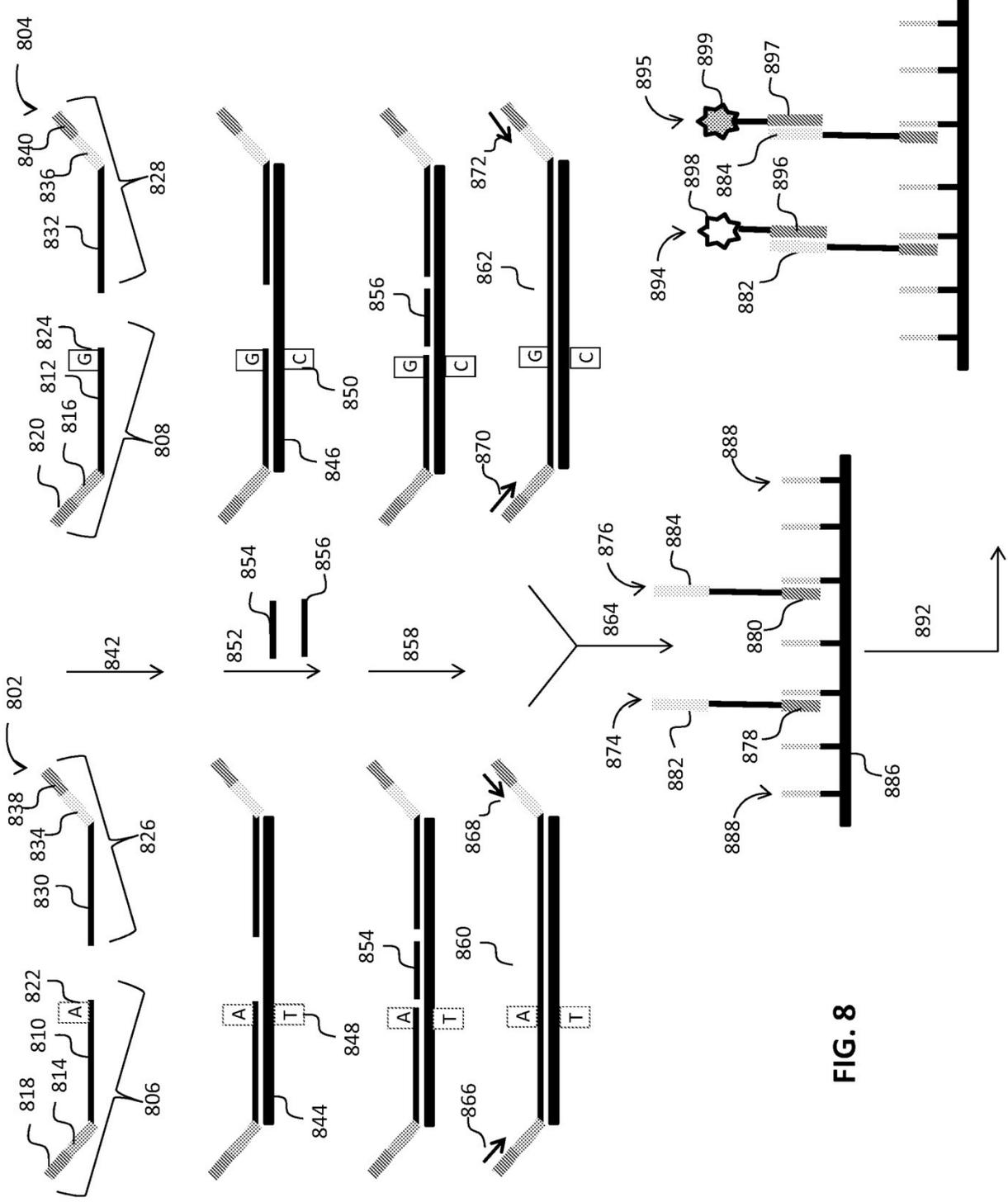


FIG. 8

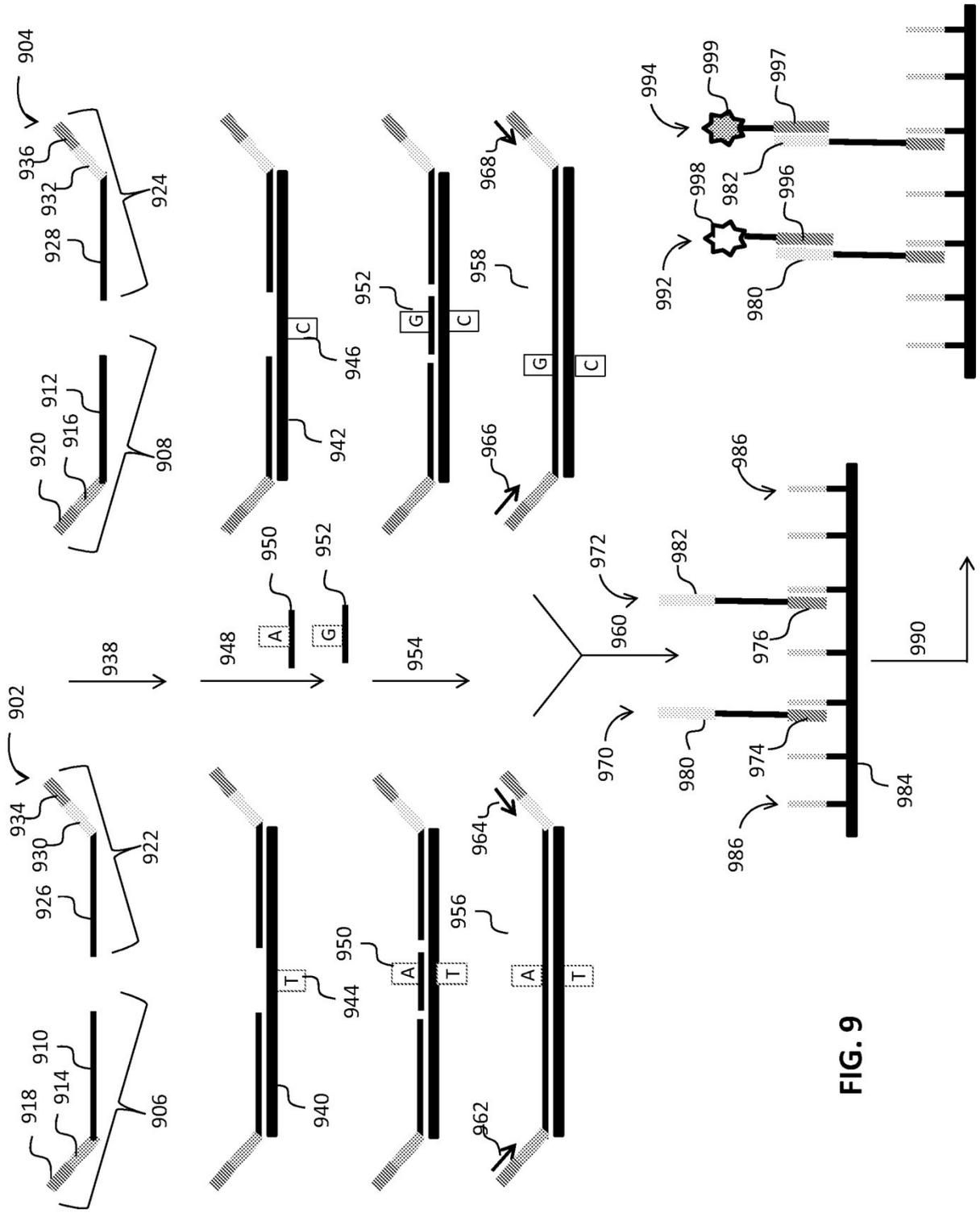


FIG. 9

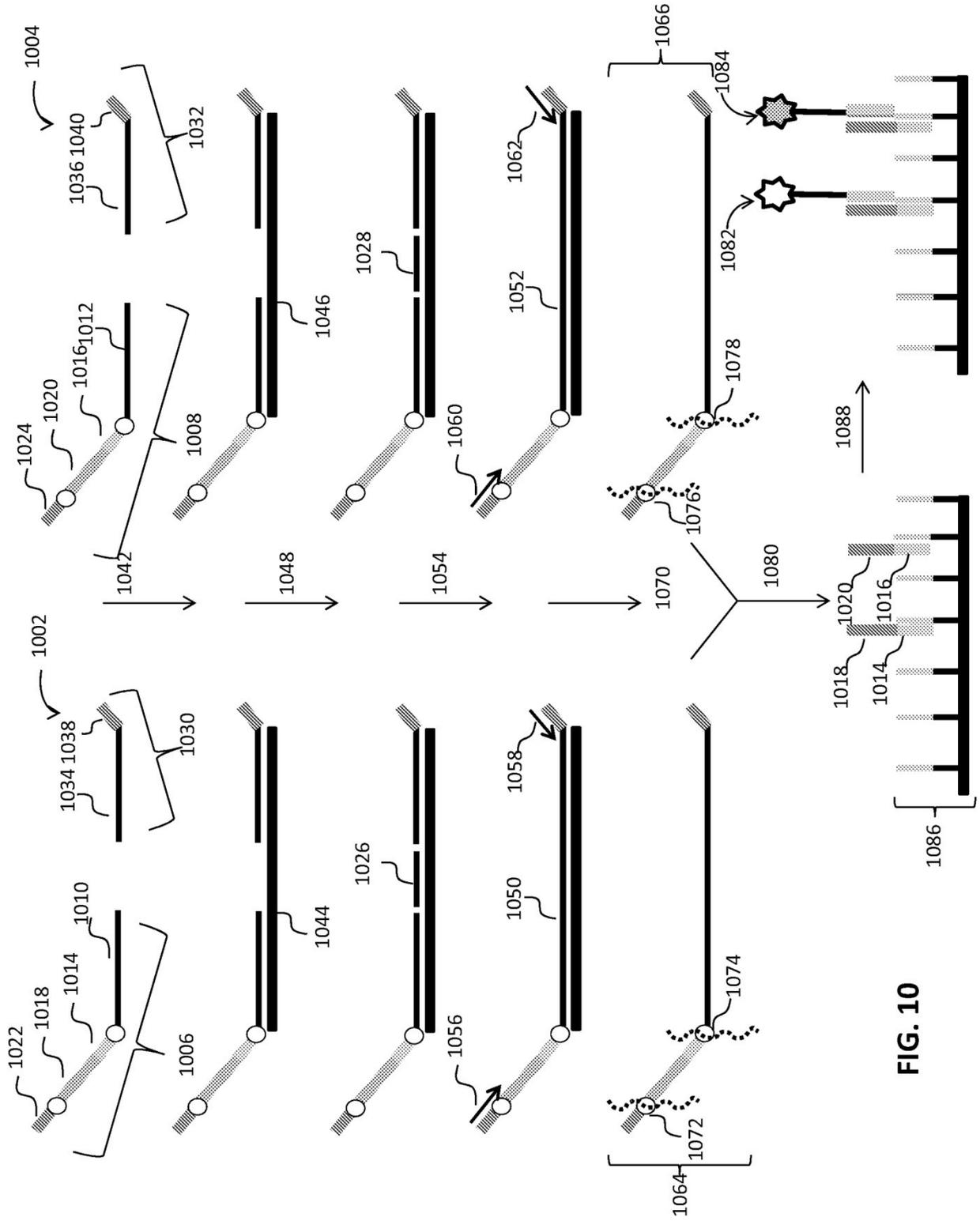


FIG. 10

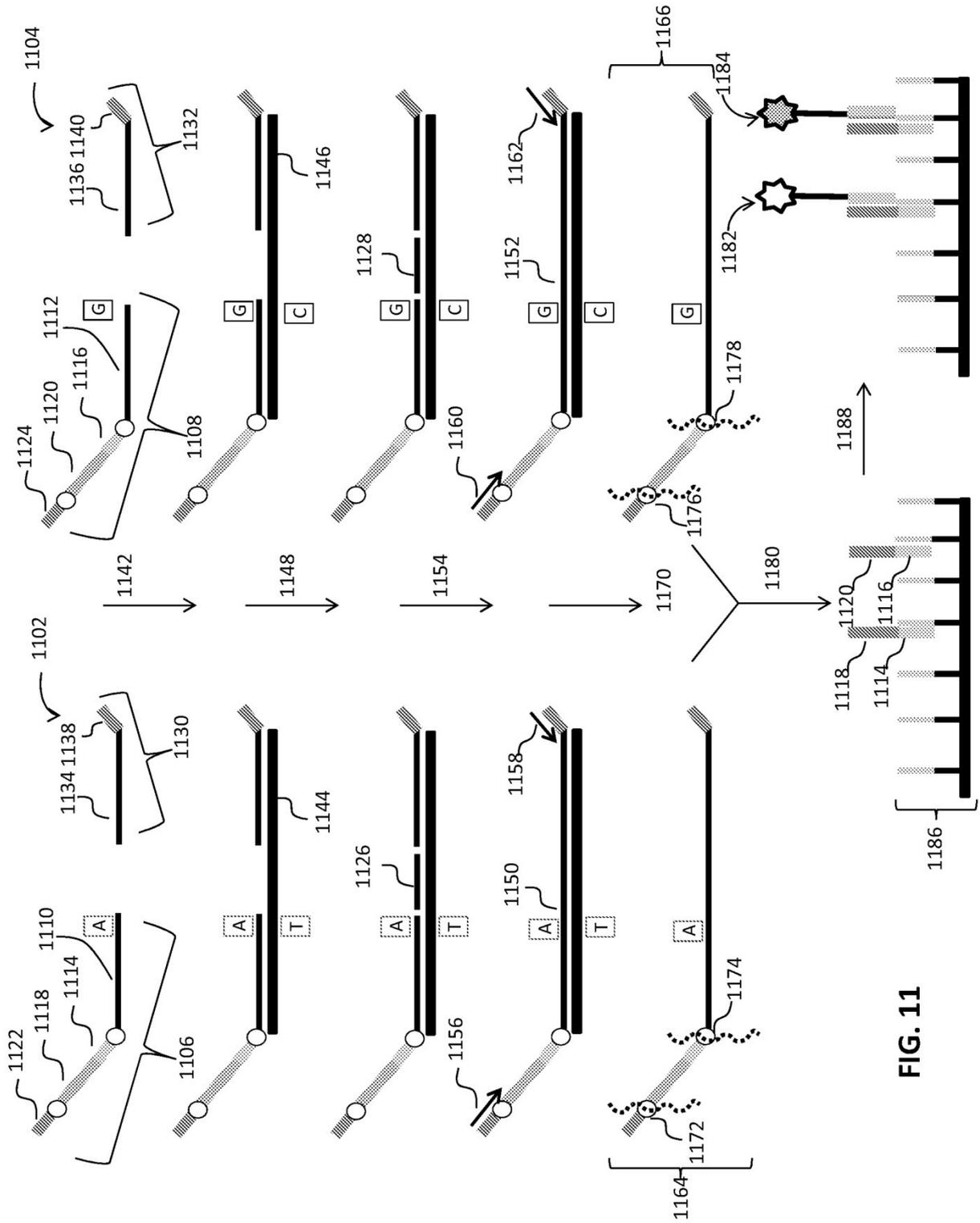


FIG. 11

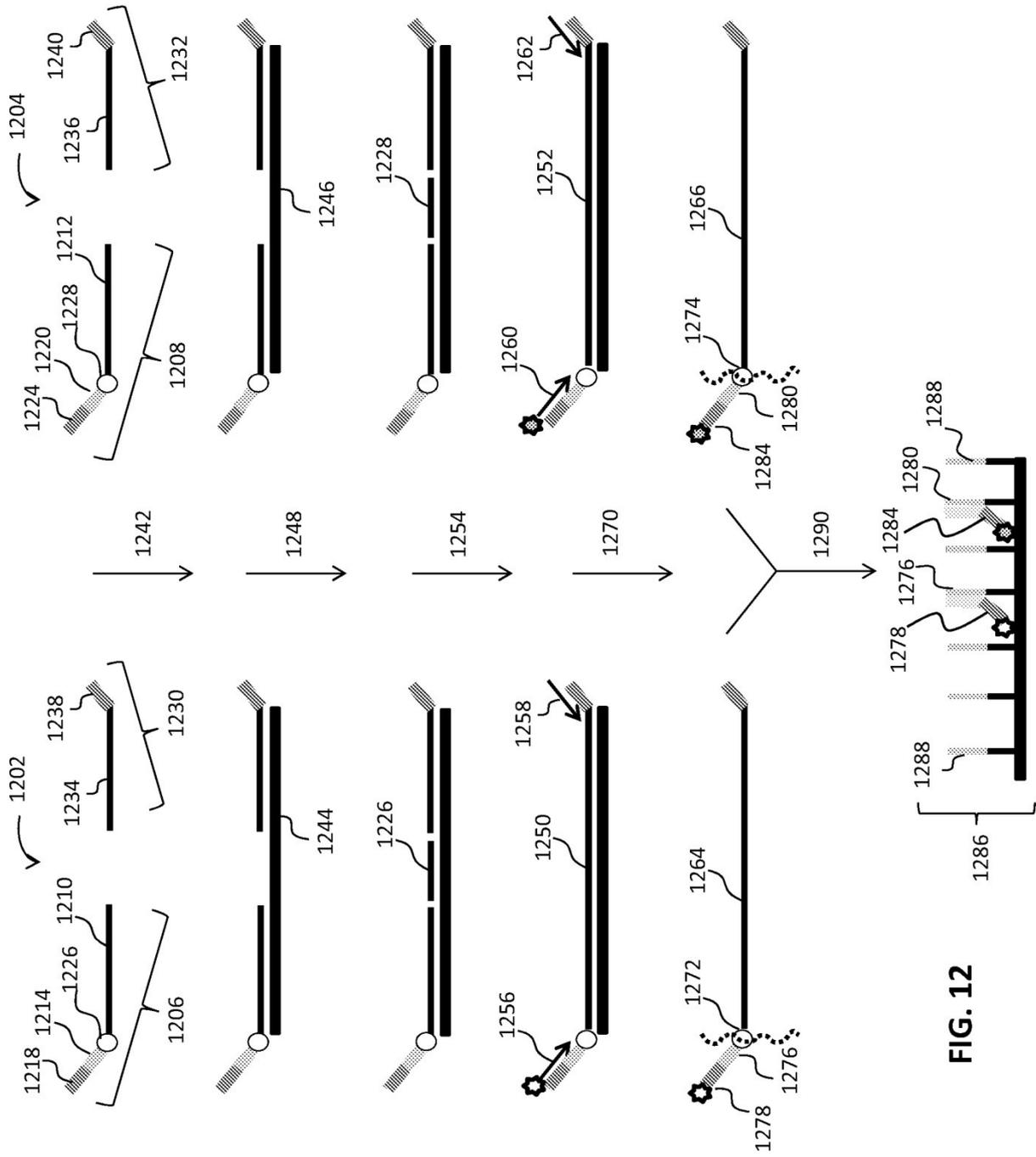


FIG. 12

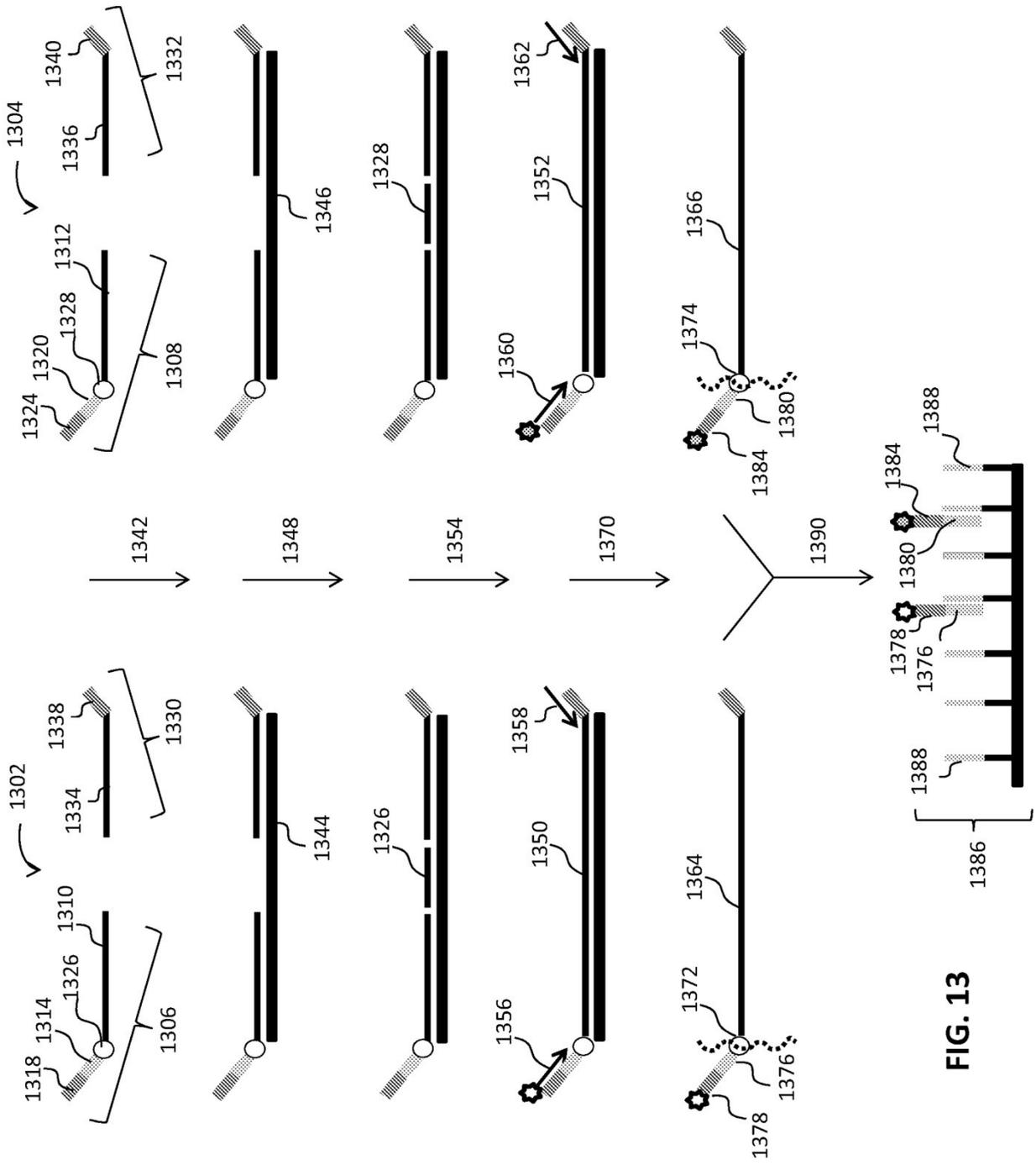
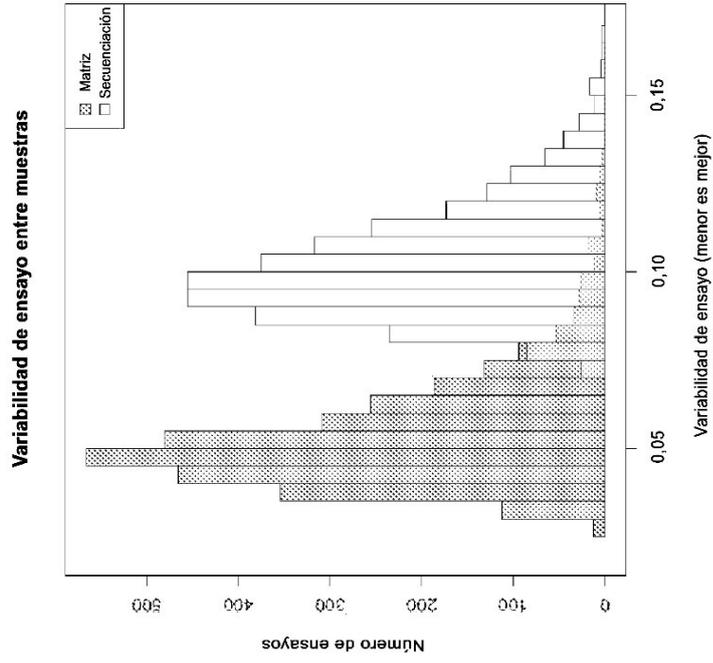


FIG. 13



**FIG. 14**