

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 228**

51 Int. Cl.:

**C40B 30/04** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2015 PCT/US2015/055126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057993**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2015 E 15849578 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3204536**

54 Título: **Métodos relacionados con los ensayos de células del trofoblasto extraveloso fetal**

30 Prioridad:

**10.10.2014 US 201462062433 P**

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

**31.08.2020**

73 Titular/es:

**WAYNE STATE UNIVERSITY (100.0%)  
5057 Woodward Ave Suite 6306  
Detroit, MI 48202, US**

72 Inventor/es:

**ARMANT, D. RANDALL y  
DREWLO, SASCHA**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 781 228 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**

Métodos relacionados con los ensayos de células del trofoblasto extraveloso fetal

**Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere en general a células del trofoblasto extraveloso fetal y métodos de ensayo de detección y diagnóstico prenatal de variaciones genéticas y afecciones patológicas. De acuerdo con aspectos específicos de la divulgación, se describen en el presente documento los métodos de aislamiento y ensayo de ARN de células del trofoblasto extraveloso fetal de un feto de una gestación en curso. La invención se refiere en general a un método de ensayo de ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal.

**Antecedentes de la invención**

La detección y diagnóstico prenatal de variaciones genéticas y afecciones patológicas son útiles para controlar y mantener la salud y bienestar tanto de la madre como del feto. Los métodos no invasivos carecen de la obtención y análisis de células fetales que normalmente son escasas en número. El documento WO 2014/062995 A1 describe un método para la recuperación y aislamiento de células fetales a partir de una muestra endocervical para el diagnóstico prenatal. Hay una necesidad continua de ensayos que alerten a los clínicos de anomalías en gestaciones en curso, tal como el Síndrome de Down y otros trastornos del número de cromosomas, el diagnóstico de enfermedades hereditarias, y patologías del feto en gestaciones en las que se desarrollará la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino.

**Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona:

1. Un método de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal, que comprende:
  - proporcionar una muestra endocervical materna obtenida de un sujeto gestante;
  - fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un aldehído fijador que produce células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído;
  - retirar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído aisladas;
  - lavar las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído aisladas o lavar un lisado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído aisladas para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador de aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavado o lisado lavado;
  - extraer el ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavado o el lisado lavado; y
  - ensayar el ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal;

donde el tratamiento con el fijador de aldehído se lleva a cabo antes de la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna.
2. El método del artículo 1, donde la muestra endocervical materna se fija inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante.
3. El método de cualquiera de los artículos 1 o 2, donde la muestra endocervical materna está fijada:
  - (a) en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con el fijador aldehído que produce las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído; o
  - (b) mediante el tratamiento con el fijador aldehído inmediatamente después de la obtención de la muestra del sujeto gestante.
4. El método de cualquiera de los artículos 1-3, donde el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal comprende la secuenciación, PCR, PCR cuantitativa, PCR en tiempo real o una combinación de dos cualquiera o más de las mismas.
5. El método de cualquiera de los artículos 1-4, donde el sujeto gestante es un ser humano.
6. El método de cualquiera de los artículos 1-5, donde la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna comprende poner en contacto las células del trofoblasto extraveloso fetal con un anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el anticuerpo no se une a las células

maternas de la muestra endocervical materna.

7. El método de cualquiera de los artículos 1-6, donde el anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal está unido a un soporte.

8. El método de cualquiera de los artículos 1-7, donde ni la Proteína A ni la Proteína G está unidas al soporte.

9. El método de cualquiera de los artículos 1-8, donde el soporte es una pluralidad de partículas magnéticas.

10. El método de cualquiera de los artículos 1-9, donde la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna comprende la exposición de las partículas magnéticas a un imán.

11. El método de cualquiera de los artículos 1-10, donde la muestra endocervical materna no está tratada con un agente mucolítico.

### Sumario y otros aspectos de la divulgación

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído que produce células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído; el lavado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas, la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas mediante el tratamiento con un fijador aldehído que produce células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído aisladas; la lisis de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído aisladas para producir un lisado; el lavado del lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo un lisado lavado; la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal del lisado lavado; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído que produce células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído, donde el tratamiento con el fijador aldehído se lleva a cabo antes y/o después de retirar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; el lavado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas, la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna para producir célula del trofoblasto extraveloso fetal aisladas; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído que produce células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído, donde el tratamiento con el fijador aldehído se lleva a cabo antes y/o después de retirar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; el lisado de las células del trofoblasto extraveloso fetal después de la fijación con aldehído para producir un lisado, el lavado de lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo un lisado lavado; la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal del lisado lavado; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna, para producir células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído para producir células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído, donde la muestra endocervical materna se fija en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante

5 y antes de fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído, para producir células de trofoblasto extraveloso fetal fijadas y donde el tratamiento con el fijador aldehído se lleva a cabo antes y/o después de aislar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; el lavado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas, la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

10 Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante; la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído para producir células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído, donde la muestra endocervical materna se fija en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído, para producir células de trofoblasto extraveloso fetal fijadas y donde el tratamiento con el fijador aldehído se lleva a cabo antes y/o después de aislar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; el lisado de las células del trofoblasto extraveloso fetal a continuación de la fijación con aldehído, para producir un lisado, el lavado del lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, para producir un lisado lavado; la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir del lisado lavado; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

25 Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído para producir células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído, donde la muestra endocervical materna se fija en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído, para producir células de trofoblasto extraveloso fetal fijadas; el lavado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas, la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

40 Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna, para producir células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído para producir células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído, donde la muestra endocervical materna se fija en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído, para producir células de trofoblasto extraveloso fetal fijadas; el lisado de las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas después de la fijación con aldehído para producir un lisado, el lavado del lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo un lisado lavado, la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir del lisado lavado; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

50 Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la fijación de las células de la muestra endocervical materna en un fijador aldehído inmediatamente después de la obtención de la muestra del sujeto gestante; la retirada de células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; el lavado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas, la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extraveloso fetal.

60 Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, la fijación de las células de la muestra endocervical materna en un fijador aldehído inmediatamente después de la obtención de la muestra del sujeto gestante; la retirada de células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; el lisado de las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas después de la fijación con aldehído para producir un lisado, el lavado del lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo un lisado lavado, la extracción del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal a partir del lisado lavado;



extravelloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído, para producir células de trofoblasto extravelloso fetal fijadas y donde el tratamiento con el fijador aldehído se lleva a cabo antes y/o después de aislar las células del trofoblasto extravelloso fetal de la muestra endocervical materna; el lavado de las células del trofoblasto extravelloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, para producir el lisado de las células del trofoblasto extravelloso fetal aisladas a continuación de la fijación con aldehído, produciendo un lisado, el lavado del lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, para producir un lisado lavado; la extracción del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal a partir del lisado lavado; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extravelloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extravelloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto humano gestante, la retirada de las células del trofoblasto extravelloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extravelloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído para producir células del trofoblasto extravelloso fetal fijadas en aldehído, donde la muestra endocervical materna se fija en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las células del trofoblasto extravelloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído, para producir células de trofoblasto extravelloso fetal fijadas; el lavado de las células del trofoblasto extravelloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extravelloso fetal lavadas, la extracción del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal a partir de las células del trofoblasto extravelloso fetal lavadas; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extravelloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extravelloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto humano gestante, la retirada de las células del trofoblasto extravelloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extravelloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído para producir células del trofoblasto extravelloso fetal fijadas en aldehído, donde la muestra endocervical materna se fija en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las células del trofoblasto extravelloso fetal mediante el tratamiento con un fijador aldehído, para producir células de trofoblasto extravelloso fetal fijadas; el lisado de las células del trofoblasto extravelloso fetal aisladas después de la fijación con aldehído para producir un lisado, el lavado del lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo un lisado lavado, la extracción del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal a partir del lisado lavado; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extravelloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extravelloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto humano gestante, la fijación de las células de la muestra endocervical materna en un fijador aldehído inmediatamente después de la obtención de la muestra del sujeto gestante; la retirada de células del trofoblasto extravelloso fetal de la muestra endocervical materna; el lavado de las células del trofoblasto extravelloso fetal fijadas con aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extravelloso fetal lavadas, la extracción del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal a partir de las células del trofoblasto extravelloso fetal lavadas; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extravelloso fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extravelloso fetal que incluyen: la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto humano gestante, la fijación de las células de la muestra endocervical materna en un fijador aldehído inmediatamente después de la obtención de la muestra del sujeto gestante; la retirada de células del trofoblasto extravelloso fetal de la muestra endocervical materna; el lisado de las células del trofoblasto extravelloso fetal aisladas después de la fijación con aldehído para producir un lisado, el lavado del lisado para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo un lisado lavado, la extracción del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal a partir del lisado lavado; y el ensayo del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal para determinar una o más características del ARN células del trofoblasto extravelloso fetal.

Adicionalmente se describe en el presente documento métodos de ensayo del ARN de células del trofoblasto extravelloso fetal que incluyen el ensayo del ARN celular del trofoblasto extravelloso fetal por secuenciación, PCR, PCR cuantitativa, PCR en tiempo real o una combinación de dos cualquiera o más de las mismas.

Adicionalmente se describen en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extravelloso fetal que incluyen la retirada de las células del trofoblasto extravelloso fetal de la muestra endocervical materna comprende poner en contacto las células del trofoblasto extravelloso fetal con un anticuerpo específico para las células del trofoblasto extravelloso fetal, donde el anticuerpo no se une a las células maternas de la muestra endocervical materna.

Adicionalmente se describen en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna comprende poner en contacto las células del trofoblasto extraveloso fetal con un anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el anticuerpo no se une a las células maternas de la muestra endocervical materna y donde el anticuerpo específico de las células del trofoblasto extraveloso fetal está unido a un soporte.

Se describen en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal, en los que ni la Proteína A ni la proteína G están unidas al soporte.

Adicionalmente se describen en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna comprende poner en contacto las células del trofoblasto extraveloso fetal con un anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el anticuerpo no se une a las células maternas de la muestra endocervical materna y donde el anticuerpo específico de las células del trofoblasto extraveloso fetal está unido a un soporte, donde el soporte es una pluralidad de partículas magnéticas y la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna comprende la exposición de las partículas magnéticas a un imán.

Se describen en el presente documento métodos de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal, en los que la muestra endocervical materna no se trata con un agente mucolítico.

Adicionalmente, se describen en el presente documento métodos de ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante; poner en contacto la muestra endocervical materna con un primer anticuerpo, el primer anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el primer anticuerpo no se une a las células maternas de la muestra endocervical materna; poner en contacto la muestra endocervical materna con uno o más anticuerpos adicionales, donde el primer anticuerpo y cada uno de los anticuerpos adicionales está marcado, de manera que se puede distinguir, con diferentes marcadores detectables por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, la nebulización de la muestra endocervical materna para separar las células; y llevar a cabo la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente sobre las células, ensayando de esta manera las células del trofoblasto extraveloso fetal.

Adicionalmente, se describen en el presente documento métodos de ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante; poner en contacto la muestra endocervical materna con un primer anticuerpo, el primer anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el primer anticuerpo es específico del complejo mayor de histocompatibilidad, Clase I, G (HLA-G); poner en contacto la muestra endocervical materna con uno o más anticuerpos adicionales, donde el primer anticuerpo y cada uno de los anticuerpos adicionales está marcado, de manera que se puede distinguir, con diferentes marcadores detectables por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, la nebulización de la muestra endocervical materna para separar las células; y llevar a cabo la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente sobre las células, ensayando de esta manera las células del trofoblasto extraveloso fetal.

Adicionalmente, se describen en el presente documento métodos de ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante; poner en contacto la muestra endocervical materna con un primer anticuerpo, el primer anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el primer anticuerpo no se une a las células maternas de la muestra endocervical materna; poner en contacto la muestra endocervical materna con uno o más anticuerpos adicionales, donde el uno o más anticuerpos adicionales es un anticuerpo específico de una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en galectina 13, galectina 14, factor de crecimiento placentario, proteína A plasmática asociada a gestación, proteína alfa fetal, endoglina, tirosina cinasa 1 relacionada con fms y queratina-7, donde el primer anticuerpo y cada uno de los anticuerpos adicionales está marcado, de manera que se puede distinguir, con diferentes marcadores detectables por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, la nebulización de la muestra endocervical materna para separar las células; y llevar a cabo la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente sobre las células, ensayando de esta manera las células del trofoblasto extraveloso fetal.

Adicionalmente, se describen en el presente documento métodos de ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante; poner en contacto la muestra endocervical materna con un primer anticuerpo, el primer anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el primer anticuerpo es específico del complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, G (HLA-G); poner en contacto la muestra endocervical materna con uno o más anticuerpos adicionales, donde el uno o más anticuerpos adicionales es un anticuerpo específico de una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en galectina 13, galectina 14, factor de crecimiento placentario, proteína A plasmática asociada a gestación, proteína alfa fetal, endoglina, tirosina cinasa 1 relacionada con fms y queratina-7, donde el primer anticuerpo y cada uno de los anticuerpos adicionales está marcado, de manera que se puede distinguir, con diferentes marcadores detectables por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, la nebulización de la muestra endocervical materna para separar las células; y llevar a cabo la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente sobre las células, ensayando de esta manera las células del trofoblasto extraveloso fetal.

Se describen en el presente documento métodos de ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal y/o el ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde la muestra endocervical materna no se trata con un agente mucolítico.

5

Como se describe en el presente documento, se puede recolectar una muestra aproximadamente a las tres semanas después de la concepción en una gestación en curso (edad gestacional de 5 semanas) hasta aproximadamente 20 semanas de gestación (punto medio de la gestación) o más tarde.

## 10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra las recuperaciones de ARN de 19 especímenes endocervicales maternos, el ARN aislado de especímenes ThinPrep "en bruto", células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas (Extravillous Trophoblast, EVT) o muestras vaciadas de células del trofoblasto extraveloso fetal que contienen células maternas;

15

La Figura 2 es un gráfico que muestra los valores de Ct de la PCR cuantitativa (qPCR) de cuatro ARN de diferente cantidad conocida a partir de especímenes ThinPrep en bruto, células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas (EVT) y células maternas privadas de células del trofoblasto extraveloso fetal (maternas);

20

La Figura 3 es una imagen de un gel que muestra los resultados de la electroforesis del ARN aislado de 3 preparaciones fetales y 3 maternas de un único espécimen endocervical materno;

La Figura 4A es un gráfico que muestra los resultados de la secuenciación de ARN y la comparación de los niveles de expresión de ARN en dos muestras maternas como los valores de las "lecturas por kilobases de la transcripción por millón de lecturas mapeadas (Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads, RPKM) que muestra la similitud de dos muestras de ARN materno;

25

La Figura 4B es un gráfico que muestra los resultados de la secuenciación de ARN y la comparación de los niveles de expresión de ARN en dos muestras fetales como valores de RPKM que muestra la similitud de dos muestras de ARN fetal;

30

La Figura 4C es un gráfico que muestra los resultados de la secuenciación de ARN y la comparación de los niveles de expresión de ARN en muestras fetales y maternas como valores de RPKM que muestra las diferencias entre las muestras de ARN fetal y materno;

35

La Figura 5A es un gráfico que muestra el espectro de secuenciación MS2 para la m/z 829,01 iónica en un análisis de Selección de Precursor Sincronizado (SPS) en células HRT-8/SVneo marcadas con TMT10plex;

La Figura 5B es un gráfico que muestra el espectro de secuenciación MS2 para iones indicadores 126 a 131 a resolución media en un análisis de Selección de Precursor Sincronizado (Synchronized Precursor Selection, SPS) en células HRT-8/SVneo marcadas con TMT10plex;

40

La Figura 5C es un gráfico que muestra el espectro de secuenciación MS2 para los iones indicadores 126 a 131 a alta resolución en un análisis de Selección de Precursor Sincronizado (SPS) en células HRT-8/SVneo marcadas con TMT10plex en las que los canales de m/z 126 a m/z 131 contenían el número indicado de células HRT;

45

La Figura 6 es un gráfico que muestra la expresión de biomarcadores en células del trofoblasto extraveloso fetal obtenidas por un método de acuerdo con aspectos de la presente invención, se muestran gráficos de cuadros de las intensidades de fluorescencia medias (RFU) donde la línea horizontal es la media, el cuadro delinea los primeros cuartiles lejos de la mediana, las barras indican los segundos cuartiles lejos de la mediana y los atípicos se indican como puntos. Cada par de control y gestaciones adversas son significativamente diferentes de acuerdo con el ensayo de rangos firmados de Wilcoxon, excepto KRT7; y

50

La Figura 7 es un gráfico que muestra la cuantificación de expresión de biomarcador en la recuperación y aislamiento del trofoblasto de las células (EVT) del trofoblasto extraveloso aislado del cuello uterino (TRIC); las células EVT marcadas con anticuerpos contra las proteínas indicadas se plasmaron en imágenes para obtener los valores de unidad de fluorescencia relativa (UFR), como se describe en los Ejemplos; se empleó el ensayo de Wilcoxon no paramétrico para comparar la expresión de cada marcador proteico entre los grupos de control (blanco) y de pérdida precoz de gestación (Early Pregnancy Loss, EPL) (negro); las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) se indican por una barra y un asterisco sobre los pares de control/EPL. Caja = 25° a 75° percentiles; línea horizontal dentro de la caja = mediana; bigote = 1,5 x rango intercuartilico (3° cuartil a 1° cuartil); los puntos representan atípicos individuales.

60

## Descripción detallada de la invención

Los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen la intención de tener los significados comúnmente entendidos por los expertos habitados en la técnica. Dichos términos se encuentran definidos y se

65

utilizan en el contexto en distintas referencias convencionales que incluyen de manera ilustrativa J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed., 2001; F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002; B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4ª Ed., Garland, 2002; D.L. Nelson y M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; Engelke, D.R., *RNA Interference (RNAi): Nuts y Bolts of RNAi Technology*, DNA Press LLC, Eagleville, PA, 2003; Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004; A. Nagy, M. Gertsenstein, K. Vintersten, R. Behringer, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 15 de diciembre de 2002, ISBN-10: 0879695919; Kursad Turksen (Ed.), *Embryonic stem cells: methods and protocols in Methods Mol Biol.* 2002; 185, Humana Press; Current Protocols in Stem Cell Biology, ISBN: 9780470151808.

Los términos en singular "un", "una" y "el/la" no tienen la intención de ser limitantes e incluyen los referentes en plural a menos de que se establezca explícitamente otra cosa o el contexto indique claramente otra cosa.

Las composiciones y métodos relacionados con el aislamiento y ensayo de las células fetales de un feto de una gestación en curso se desvelan en el presente documento.

El análisis de células fetales proporciona información acerca del feto, tal como el género, y permite la detección de anomalías fetales, incluyendo aneuploidías cromosómicas, así como trastornos asociados a la gestación incluyendo la preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino, aborto espontáneo y nacimiento prematuro.

El análisis de las células fetales permite la detección de biomarcadores de trastornos asociados a gestación incluyendo preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino, aborto espontáneo y nacimiento prematuro.

Los ensayos descritos en el presente documento son ensayos opcionalmente de uno o más biomarcadores expresados por las células del trofoblasto extraveloso fetal para detectar cambios indicativos de una función placentaria anormal tales como la preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino, aborto espontáneo y nacimiento prematuro.

Aunque las composiciones y métodos se describen en el presente documento con referencia en particular a las hembras humanas y fetos humanos, no se limitan a seres humanos y se pueden aislar y analizar de manera similar células fetales de otras especies.

#### Métodos de aislamiento de células del trofoblasto extraveloso fetal

Se describen en el presente documento métodos de aislamiento de células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la obtención de una muestra endocervical materna que contiene células del trofoblasto extraveloso fetal de un sujeto gestante; el tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal con una nucleasa, y la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna, aislando de esta manera las células del trofoblasto extraveloso fetal.

Una muestra endocervical materna se recolecta de una hembra gestante desde aproximadamente 1 semana a aproximadamente 45 semanas de gestación, tal como en el primer trimestre, segundo trimestre y/o tercer trimestre de gestación.

Como se describe en el presente documento, se puede recolectar una muestra aproximadamente a las tres semanas después de la concepción (edad gestacional de 5 semanas) hasta aproximadamente 20 semanas de gestación (punto medio de la gestación) o más tarde.

El tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal con una nucleasa se consigue utilizando cualquier nucleasa eficaz para escindir ADN y/o ARN. Dichas nucleasas incluyen las endonucleasas y exonucleasas. Ejemplos no limitantes de nucleasas que se pueden utilizar para tratar células del trofoblasto extraveloso fetal incluyen desoxirribonucleasas (DNasas), que incluyen pero no se limitan a: DNasa I, DNasa II, exonucleasa lambda, nucleasa Bal-31, exorribonucleasas, exonucleasas de *E. coli* I II, III, IV, V, VI, VII, y VIII, endonucleasas de restricción tales como Aat II, Ace I, Acu I, Afl III, Age I, Ale I, Alu I, Alw I, Alw44 I, Apa I, Apo I, Asc I, ase I, Asn I, Ava I, Ava II, Bae I, BamH I, Ban I, Ban II, Bel I, Bgl I, Bgl H, Bin I, Blp I, Bmr I, Bmt I, Bpm I, Bsg I, Bsm I, Bsr I, BssH II, BstE H, Btg I, Bts I, Cfo I, Cla I, Dde I, Dpn I, Dpn II, Dra I, Drd I, Eae I, Eag I, Ear I, Eci I, EclX I, EcoR I, EcoR II, EcoR V, Fat I, Fau I, Fok I, Fse I, Hae II, Hae III, Hga I, Hha I, Hinc II, Hind EI, Hpa I, Hpa II, Kas I, Kpn I, Ksp I, Mbo I, Mbo H, Mfe I, Mlu I, MluN I, Mly I, Mme I, Mnl I, Msc I, Mse I, Msp I, Mwo I, Nae I, Nar I, Nci I, Nco I, Nde I, Nde II, Nhe I, Not I, Nru I, Nsi I, Nsp I, Pac I, Pci I, Pie I, Pme I, Pml I, Psi I, Psp I, Pst I, Pvu I, Pvu II, Rsa I, Sac I, Sal I, Sap I, Sbf I, Sau3 A I, Sea I, ScrF I, Sfcl, Sfi I, Sfol, Sma I, Sml I, Spe I, Sph I, Ssp I, Stu I, Sty I, Swa I, Taq I, Xba I, Xho I Xma I y Xmn I, endonucleasa de *E. coli* I o II, endonucleasa T7, endonucleasa T4, nucleasa microcócica, endonucleasa RecBCD, nucleasa SI, nucleasa PI y nucleasa de judía mungo. Ejemplos no limitantes de nucleasas que se pueden utilizar para tratar células del trofoblasto extraveloso fetal incluyen ribonucleasas (RNasas), incluyendo endorribonucleasas y exorribonucleasas tales como RNasa A, RNasa D, RNasa H, RNasa L, RNasa P, RNasa PH, RNasa PhyM, RNasa R, RNasa TI, RNasa T2, RNasa U2, polinucleótido fosforilasa, oligorribonucleasa, exorribonucleasa I, exorribonucleasa II, RNasa I, RNasa II y RNasa III.

Opcionalmente, las células del trofoblasto extraveloso fetal se tratan con dos o más nucleasas.

5 El tratamiento con nucleasas de las células del trofoblasto extraveloso fetal se lleva a cabo en condiciones de reacción de nucleasa, normalmente en un tampón fisiológico a pH y temperatura fisiológicos.

10 El tratamiento con nucleasa de las células del trofoblasto extraveloso fetal se lleva a cabo sin la fijación de las células, antes de la fijación o después de la fijación de las células de acuerdo con los aspectos de los métodos de la presente divulgación.

15 El tratamiento con nucleasa de las células del trofoblasto extraveloso fetal se lleva a cabo antes del aislamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna o después del aislamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna de acuerdo con aspectos de los métodos de la presente divulgación. Se aprecia que el tratamiento con nucleasa de células del trofoblasto extraveloso fetal se lleva a cabo antes del aislamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna también es el tratamiento de la muestra endocervical materna con una nucleasa.

20 El tratamiento con nucleasa de muestra endocervical materna se lleva a cabo sin la fijación de las células, antes de la fijación o después de la fijación de la muestra de acuerdo con los aspectos de los métodos de la presente divulgación.

25 Opcionalmente, se une una o más nucleasas a un soporte y las células del trofoblasto extraveloso fetal se tratan con la una o más nucleasas poniendo en contacto las células de trofoblasto extraveloso fetal y la una o más nucleasas unidas al soporte en condiciones de reacción de nucleasa. El soporte se dimensiona para evitar la entrada en las células del trofoblasto extraveloso fetal y/o células maternas de la muestra endocervical materna. En una opción preferida, las células del trofoblasto extraveloso fetal tratado con una o más nucleasas unidas a un soporte son células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas.

30 Un soporte puede ser sólido o semisólido y es insoluble en soluciones acuosas. El soporte puede ser cualquiera de distintos materiales tales como cristal, silicio, gel de sílice, yeso, papel, un polímero de origen natural o sintético, tal como el polietileno, poliésteres, poliamidas, poliuretanos, poliepóxidos, poliestireno, policarbonato, polipropileno, cloruro de polivinilo, polivinilacetato, PVDF, polimetacrilatos, nailon, celulosa, ésteres de celulosa, mezclas de ésteres de celulosa, éteres de celulosa, ácido alginico reticulado, gomas guar reticuladas y sustituidas, agar, agarosa, gelatinas, dextrano y poliacrilamidas, mezclas, copolímeros y terpolímeros de dichos polímeros o cualquiera otro material al que se pueda unir una nucleasa.

35 Un soporte que se utiliza puede incluir grupos funcionales para la unión de una nucleasa, tal como, pero sin limitarse a carboxilo, amina, amino, carboxilato, hálido, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido de azufre, óxido de nitrógeno, grupos funcionales epoxi y/o tosilo. La unión de una nucleasa a un soporte se consigue por cualquiera de distintos métodos, incluyendo de manera ilustrativa la adsorción y el enlace químico. En un ejemplo, se puede utilizar el clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, química ECD o EDAC, para unir una nucleasa a un soporte. Una nucleasa se puede enlazar directa o indirectamente al material del soporte, por ejemplo, mediante un enlace con un revestimiento o enlazador dispuesto sobre el soporte. Los grupos funcionales, la modificación de los mismos y la unión de una proteína a un soporte se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en Fitch, R. M., Polymer Colloids: A Comprehensive Introduction, Academic Press, 1997.

40 Un soporte para la unión de una nucleasa puede ser en cualquiera de una variedad de formas y maneras que incluyen, pero no se limitan a, placas de microtitulación, pocillos de microtitulación, agujas, fibras, perlas, portaobjetos, chips de silicio y membranas tales como una membrana de nitrocelulosa o PVDF.

45 Opcionalmente, una nucleasa se une a un soporte que tiene forma de partícula. Dichas partículas pueden ser partículas sólidas o semisólidas de cualquiera de una variedad de formas y tamaños. Las partículas son de manera ilustrativa partículas orgánicas o inorgánicas, tal como cristal o metal y pueden ser partículas de un polímero de origen natural o sintético, tal como poliestireno, policarbonato, silicio, nailon, celulosa, agarosa, dextrano, poliacrilamida; y perlas de látex.

50 El soporte y la nucleasa unida tienen un tamaño que prohíbe la entrada en las células fijadas, por ejemplo, un tamaño de partículas mayor de 10 nm de diámetro.

55 Como se desvela en el presente documento, la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna puede conseguirse poniendo en contacto las células del trofoblasto extraveloso fetal con un anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el anticuerpo no se une a las células maternas de la muestra endocervical materna, y capturando las células del trofoblasto extraveloso fetal unidas a los anticuerpos.

60 Como se desvela en el presente documento, el anticuerpo puede ser específico del complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, G (HLA-G).

5 Opcionalmente, el anticuerpo específico de las células del trofoblasto extraveloso fetal se une a cualquier sólido o semisólido que es insoluble en soluciones acuosas, tal como las descritas en el presente documento para la unión de una nucleasa. La unión del anticuerpo al soporte se consigue por cualquiera de distintos métodos, incluyendo de manera ilustrativa la adsorción y el enlace químico como se ha descrito para la unión de la nucleasa.

10 Opcionalmente, el anticuerpo específico de las células del trofoblasto extraveloso fetal se une directamente a un soporte. La expresión "unido directamente" se utiliza para indicar que el soporte está unido covalente o no covalentemente al anticuerpo específico de las células del trofoblasto extraveloso fetal y que el soporte no está unido al anticuerpo mediante un anticuerpo secundario.

15 En una opción adicional, el anticuerpo específico de las células del trofoblasto extraveloso fetal se une a un soporte sin la intervención de una molécula de proteína A o Proteína G. Por lo tanto, de acuerdo con aspectos particulares de los métodos de la presente invención, ni la Proteína A ni la Proteína G están unidas al soporte.

El anticuerpo específico de las células del trofoblasto extraveloso fetal se une a cualquier soporte insoluble.

20 Como se desvela en el presente documento, el soporte puede ser una pluralidad de partículas magnéticas y la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna comprende la exposición de las partículas magnéticas a un imán.

25 Las nanopartículas magnéticas acopladas directamente al anticuerpo que se une específicamente a un antígeno fetal normalmente tienen un tamaño en el intervalo de 10 nm - 1  $\mu$ m, aunque se pueden utilizar nanopartículas magnéticas más grandes o más pequeñas.

Como se desvela en el presente documento, un anticuerpo HLA-G puede unirse a nanopartículas magnéticas.

30 Opcionalmente, los métodos de aislamiento de células del trofoblasto extraveloso fetal incluyen adicionalmente fijar células de la muestra endocervical materna mediante el tratamiento con un fijador, donde el tratamiento con el fijador se lleva a cabo antes o después del aislamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna.

35 El tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal con una nucleasa se lleva a cabo opcionalmente antes o después de retirar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna.

El fijador que se utiliza puede ser glutaraldehído; formaldehído; paraformaldehído, o una combinación de dos cualquiera o más de los mismos. Como se desvela en el presente documento, el fijador aldehído puede ser paraformaldehído.

40 Opcionalmente, la muestra endocervical materna se fija primero en un fijador no aldehído. Las células del trofoblasto extraveloso fetal se fijan entonces con un fijador aldehído. El fijador no aldehído se retira opcionalmente o se retira parcialmente mediante un lavado de la muestra endocervical materna con un líquido o tampón fisiológico, tal como solución salina o un tampón compatible con las células de mamífero.

45 Los fijadores no aldehídos incluyen de manera ilustrativa la acetona, ácido acético, y alcoholes tales como el etanol y el metanol. Opcionalmente se utilizan combinaciones de dos o más fijadores no aldehído. Como se desvela en el presente documento, se puede utilizar una mezcla de metanol y ácido acético como fijador no aldehído.

50 Como se desvela en el presente documento, las células del trofoblasto extraveloso fetal se puede tratar con una proteasa y/o una enzima que degrade un glicosaminoglicano (GAGasa), donde el tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal con una proteasa y/o una GAGasa se lleva a cabo antes o después de retirar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna y antes o después del tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal con una nucleasa.

55 Las enzimas que degradan los glicosaminoglicanos incluyen, por ejemplo, la hialuronidasa, heparinasa y condroitinasa.

60 De acuerdo con aspectos particulares de los métodos de la presente invención, la muestra endocervical materna no se trata con un agente mucolítico. Como se describe adicionalmente en el presente documento, puede que la muestra endocervical materna no se trate con un agente mucolítico seleccionado de entre N-acetil-L-cisteína, DTT, tripsina y tripsina/EDTA. Como se ha descrito adicionalmente en el presente documento, puede que la muestra endocervical materna no se trate con uno o más de entre una colagenasa, una proteasa, una blendzima liberasa, y un agente mucolítico.

65 Opcionalmente, una muestra endocervical materna se acidifica antes del aislamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal. Un agente acidificante se añade opcionalmente a la muestra llevando el pH de la muestra a un pH de aproximadamente 5 - 6. Un agente acidificante puede ser cualquier ácido o tampón ácido, por ejemplo.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden incluir adicionalmente el ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas. Las células del trofoblasto extraveloso fetal pueden aislarse y analizarse para ayudar en el diagnóstico y tratamiento del feto y/o mujer gestante con el feto para promover la salud del feto y/o la mujer gestante del feto.

5

Dichos ensayos incluyen un ensayo de una o más proteínas o péptidos de las células del trofoblasto extraveloso fetal y/o un ensayo de uno o más ácidos nucleicos de células del trofoblasto extraveloso fetal.

10

Como se describe en el presente documento, los ensayos de unión se utilizan opcionalmente en el ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal.

15

Un ensayo de unión es un ensayo en el que un analito diana, tal como un biomarcador, se detecta al unirse con una pareja de unión. La expresión "pareja de unión" se refiere a una molécula biológica capaz de la unión específica con un analito diana. Ejemplos no limitantes de parejas de unión incluyen anticuerpos, aptámeros, receptores, ligandos y sustratos para la acción enzimática de un analito diana. Las parejas de unión también pueden ser sondas de ácido nucleico. El experto puede identificar, aislar y/o producir rutinariamente parejas de unión y utilizarlas en ensayos de unión. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos habituados en la técnica.

20

Un ensayo de unión se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquiera de los métodos que permitan la detección de uno o más analitos diana uniéndolos a una pareja de unión. La unión de un analito diana y un agente de unión se puede detectar directa o indirectamente, tal como mediante el uso de marcadores detectables.

25

Los ensayos de ácido nucleico tal como la secuenciación, un ensayo de amplificación y/o un ensayo de hibridación, se pueden utilizar para detectar la expresión de un analito diana de células del trofoblasto extraveloso fetal, tal como un biomarcador. El ADN se aísla de las células del trofoblasto extraveloso fetal de acuerdo con los procedimientos de extracción de ADN. El ARN se aísla preferentemente de las células del trofoblasto extraveloso fetal como se describe en el presente documento.

30

Los ensayos de ácido nucleico, incluye, pero no se limita a reacciones de amplificación tal como reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) tal como RT-PCR; transferencia puntual; hibridación *in situ*, transferencia de Northern; y protección de RNasa. Los detalles de dichos ensayos se describen en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed., 2001; y F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002, por ejemplo.

35

Una sonda de ácido nucleico o cebador capaz de hibridarse con un analito diana de ARNm o ADNc para detectar y/o cuantificar el ARNm o ADNc se pueden utilizar en un ensayo nucleico. Una sonda de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido de al menos 10, 15, 30, 50 o 100 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas a un ARNm o ADNc diana o una secuencia complementaria de los mismos. Un cebador de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido de al menos 10, 15 o 20 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas a un ARNm o ADNc diana o una secuencia complementaria de los mismos. Las expresiones "hibridación específica" y "se hibrida específicamente" se refiere a la hibridación de un ácido nucleico particular a un ácido nucleico diana sin una hibridación sustancial con ácidos nucleicos distintos del ácido nucleico diana en una muestra.

40

45

La rigurosidad de la hibridación y las condiciones de lavado dependen de varios factores, incluyendo la  $T_m$  de la sonda y la diana y la fuerza iónica de la hibridación y condiciones de lavado, como es bien conocido por el experto. La hibridación y condiciones para conseguir una rigurosidad de hibridación deseada se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; y Ausubel, F. et al., (Eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, Wiley, 2002.

50

Una muestra de un animal no humano se purifica opcionalmente para el ensayo de acuerdo con un método de la presente divulgación.

55

La expresión "ácido nucleico" se refiere a moléculas de ARN o ADN que tienen más de un nucleótido en cualquier forma incluyendo un oligonucleótido o polinucleótido de cadena sencilla o cadena doble. La expresión "secuencia de nucleótidos" se refiere al ordenamiento de nucleótidos en oligonucleótidos o polinucleótidos en una forma de ácido nucleico de cadena sencilla.

60

La expresión "ensayo de amplificación" se refiere a un método para copiar un ácido nucleico matriz, produciendo de esta manera ácidos nucleicos que incluyen copias de todo o parte del ácido nucleico matriz.

65

Los ensayos de amplificación incluyen los que incluyen la extensión del cebador dirigido a la matriz catalizada por una polimerasa de ácido nucleico utilizando un par de cebadores que flanquean el ácido nucleico diana, incluyendo ilustrativamente, pero no limitados a, reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR de transcripción inversa (RT-PCR), PCR mediada por ligadura (LM-PCR), PCR phi-29, y otros métodos de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, como se describe en C. W. Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 2003; y V. Demidov et al., *DNA Amplification: Current Technologies and Applications*, Taylor & Francis, 2004. El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido de cadena sencilla, normalmente aproximadamente 9-60 nucleótidos de longitud, que puede ser más largo o más corto, y que sirve como punto de inicio para la síntesis de ADN dirigida por la matriz.

5

Las condiciones de reacción apropiadas para los métodos de amplificación de ácido nucleico *in vitro* incluyen la presencia de componentes de reacción adecuados incluyendo, pero no limitados a, una polimerasa y nucleótido trifosfatos. Un experto en la técnica será capaz de determinar las condiciones adecuadas para la amplificación de los ácidos nucleicos diana solo con experimentación de rutina utilizando los cebadores de la presente divulgación incluyendo la elección de factores tales como el tampón, nucleótidos, pH, concentración de sales de Mg, concentración de cebador y temperatura. El ácido nucleico producto de los métodos de amplificación contiene opcionalmente materiales adicionales tales como, pero sin limitarse a, secuencias de ácido nucleico no diana, grupos funcionales para la reacción química y marcadores detectables presentes en los cebadores y no presentes en la matriz de ADN original. La PCR también se puede llevar a cabo como PCR cuantitativa (Q-PCR) también conocida como PCR en tiempo real o PCR cinética (KPCR). La Q-PCR se utiliza para amplificar y simultáneamente cuantificar una molécula de ADN dirigida.

10

15

20

25

Las expresiones "PCR cuantitativa" o "Q-PCR" se refiere a una variedad de métodos para cuantificar los resultados de las reacciones en cadena de polimerasa. Los métodos Q-PCR generalmente determinan o comparan el factor de amplificación, tal como la determinación del ciclo umbral (Ct), o son métodos de co-amplificación que comparan la cantidad de producto generado de la amplificación simultánea de diana y los cebadores convencionales. Muchas técnicas de Q-PCR incluyen sondas indicadoras, colorantes intercaladores o ambos. Las sondas indicadoras incluyen, pero no se limitan a sondas TaqMan® (Applied Biosystems), balizas moleculares, cebadores Scorpion®, cebadores Lux™ y cebadores FRET, y los colorantes intercaladores incluyen, pero no se limitan a bromuro de etidio, CYBR® Green (Molecular Probes) y PicoGreen® (Molecular Probes).

30

35

40

45

Para secuencias más específicas en una muestra de ADN, la PCR en tiempo real hace posible tanto la detección como la cuantificación. La cantidad puede ser un número absoluto de copias o una cantidad relativa cuando se normaliza a la entrada de ADN o genes de normalización adicionales. Dos métodos comunes de detección de productos en la PCR en tiempo real son: (1) colorantes fluorescentes no específicos que se intercalan con cualquier ADN de doble cadena, y (2) sondas de ADN específicas de secuencia que consisten en oligonucleótidos que están marcadas con un indicador fluorescente que permite la detección solo después de la hibridación de la sonda con su ADN diana complementario. Por ejemplo, se utilizan las sondas TaqMan. El principio de la sonda TaqMan se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq para escindir una sonda marcada dual durante la hibridación con la segunda diana complementaria y una detección basada en fluoróforo. Como en otros métodos de PCR en tiempo real, la señal fluorescente resultante permite las mediciones cuantitativas de la acumulación del producto durante los estadios exponenciales de la PCR; sin embargo, la sonda TaqMan aumenta significativamente la especificidad de la detección. Las sondas TaqMan consisten en un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de la sonda oligonucleotídica y un interruptor en el extremo 3'. Están disponibles varios fluoróforos diferentes (por ejemplo, 6-carboxifluoresceína, acrónimo: FAM, o tetraclorofluoresceína, acrónimo: TET) e interruptores (por ejemplo, tetrametilrodamina, acrónimo: TAMRA, o enlazador de conjunto menor de diclorociclopiroloindol tripeptídico, acrónimo: MGB). La molécula interruptora enciende la fluorescencia emitida por el fluoróforo cuando se excita con la fuente de luz del ciclador mediante FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia). Cuanto más próximos están el fluoróforo y el interruptor, el interruptor inhibe cualquier señal de fluorescencia.

50

Las sondas TaqMan se diseñan de manera que se hibridan dentro de una región de ADN amplificada por un conjunto específico de cebadores. Según la polimerasa Taq extiende el cebador y sintetiza la cadena naciente (de nuevo sobre una matriz de cadena sencilla, pero en la dirección opuesta que la que presente el diagrama, es decir, de 3' a 5' de la cadena complementaria), la actividad de 5' a 3' de la polimerasa degrada la sonda que estaba hibridada con la matriz. La degradación de la sonda libera el fluoróforo y rompe la estrecha proximidad con el interruptor remitiendo el efecto del interruptor y permitiendo la fluorescencia del fluoróforo. Por lo tanto, la fluorescencia detectada en el ciclador término de la PCR en tiempo real es directamente proporcional al fluoróforo liberado y la cantidad de ADN presente en la PCR.

55

La PCR se emplea para la amplificación del genoma completo según los aspectos de la presente divulgación..

60

Los ensayos de hibridación para un ácido nucleico diana incluyen, pero no se limitan a, transferencia puntual, hibridación de ácido nucleico, ensayos con perlas, hibridación *in situ*, transferencia de Northern, transferencia de Southern y ensayos de micromatriz. Los detalles de dichos ensayos se describen en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed., 2001; y F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002, por ejemplo.

65

Los ensayos de hibridación de ácido nucleico incluyen el uso de una sonda de ácido nucleico que se hibrida específicamente con un ácido nucleico diana en condiciones de hibridación y lavado definidas. El término "sonda" engloba secuencias de ácido nucleico de distintas longitudes, normalmente al menos de aproximadamente 9 a aproximadamente 8000 nucleótidos de longitudes, pero pueden ser más cortas o más largas a condición de que la sonda sea capaz de hibridarse específicamente con un ácido nucleico diana en un ensayo de hibridación de ácido

nucleico. Una sonda puede ser de cadena sencilla o doble y puede generarse por métodos recombinantes, síntesis química, aislamiento de fuentes naturales, o una combinación de dos o más de estas.

5 Las metodologías de secuenciación útiles en distintos ensayos, tal como para comparar transcriptomas e identificar biomarcadores, incluye la secuenciación de forma paralela masivamente, la secuenciación en tiempo real de moléculas únicas, la secuenciación Polonia, semiconductor iónico (secuenciación Ion Torrent), pirosecuenciación (454), secuenciación por síntesis (Illumina), secuenciación por ligadura (secuenciación SOLiD), terminación de cadena (secuenciación de Sanger), por ejemplo.

10 El ARN fetal se aísla de las células del trofoblasto extraveloso fetal para el ensayo de acuerdo con los aspectos de la presente invención.

15 Los métodos de aislamiento y/o ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal se describen en el presente documento, que incluye la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante, el tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal con una DNasa; la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un aldehído fijador que produce células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído; el lavado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas; y la extracción del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas.

25 Se describen en el presente documento métodos de aislamiento y/o ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal, en los que el trofoblasto extraveloso fetal no se trata con DNasa antes de la lisis de las células del trofoblasto extraveloso fetal, que incluyen la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante; la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna; la fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un aldehído fijador que produce células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído; el lavado de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído para promover la retirada de los entrecruzamientos introducidos por el fijador aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas; y la extracción del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas. La extracción del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas incluye la lisis de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lisadas.

35 Las células del trofoblasto extraveloso fetal lisadas se tratan con DNasa y una proteasa para degradar el ADN y proteínas de las células del trofoblasto extraveloso fetal.

40 El ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal se ensaya para determinar una o más características del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal y opcionalmente se compara con una referencia.

El tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal con una nucleasa se lleva a cabo opcionalmente antes o después de retirar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna.

45 En una opción adicional, la muestra endocervical materna se fija inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante. La muestra endocervical materna se fija opcionalmente de manera adicional en un fijador no aldehído inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con el fijador aldehído que produce las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído. En una opción adicional más, la muestra endocervical materna se fija mediante un tratamiento con el fijador aldehído inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante.

50 Las células del trofoblasto extraveloso fetal se tratan opcionalmente con una DNasa antes o después del aislamiento de la muestra endocervical materna.

55 De acuerdo con aspectos preferidos, las células del trofoblasto extraveloso fetal intactas no se tratan con una DNasa antes o después del aislamiento de la muestra endocervical materna. Las células del trofoblasto extraveloso fetal lisadas se tratan con una DNasa para retirar el ADN de las células del trofoblasto extraveloso fetal en un procedimiento de aislamiento del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal.

60 Las células se pueden fijar con un fijador aldehído seleccionado de entre glutaraldehído, formaldehído, paraformaldehído y mezclas de dos cualquiera o más de los mismos. De acuerdo con aspectos, las células se fijan con paraformaldehído.

65 La fijación de las células del trofoblasto extraveloso fetal se lleva a cabo en condiciones de fijación con aldehído. Las condiciones de fijación con aldehído incluyen la concentración de fijador aldehído, un tampón opcional, tiempo y temperatura.

- La concentración del fijador aldehído que se utiliza depende del tiempo de fijación deseado y la temperatura que se va a utilizar. La concentración de fijador aldehído que se utiliza está normalmente en un intervalo de un 0,1 a un 10 por ciento p/v de solución acuosa, tal como de un 0,5 a un 6 por ciento p/v por peso de la solución acuosa o de un 1 a un 4 por ciento p/v de la solución acuosa.
- 5 El fijador aldehído se puede preparar disolviendo el fijador en una solución acuosa. La solución acuosa se tampona opcionalmente, tal como mediante un tampón fisiológico a pH fisiológico.
- 10 La temperatura de fijación se puede variar, por ejemplo, dependiendo del tiempo de fijación deseado. La temperatura de fijación está normalmente en el intervalo de aproximadamente 4 °C-40 °C.
- 15 Los entrecruzamientos que se introducen por la fijación en aldehído se retiran al menos parcialmente mediante el tratamiento de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído de lavado en una solución de lavado acuosa en condiciones determinadas de calor y salinidad. La retirada de los entrecruzamientos introducidos por la fijación con aldehído se puede conseguir lavando las células en una solución de lavado en un tampón fisiológico a un pH fisiológico en el intervalo de aproximadamente un pH de 7,0-8,0, ejemplificado por, pero no limitado a, un tampón de fosfato tal como el PBS, un tampón Tris tal como el Tris-HCl, HEPES o tampón de trietanolamina, a una temperatura en el intervalo de 4 °C - 80 °C durante un tiempo en el intervalo de varios días (a temperaturas menores de la temperatura ambiente) - 15 minutos (para temperaturas por encima de aproximadamente 60 °C). La retirada de los entrecruzamientos introducidos por la fijación con aldehído se puede conseguir, por ejemplo, lavando en una solución con concentraciones salinas mayores que las fisiológicas, tales como una concentración de NaCl en el intervalo de 160 mM - 300 mM durante un tiempo en el intervalo de varios días - 15 minutos. Se pueden utilizar combinaciones de calor y concentraciones salinas mayores que las fisiológicas.
- 20
- 25 Se incluye opcionalmente un agente estabilizante en la solución de lavado, ejemplificado por, pero no limitado a, EDTA. El EDTA está presente opcionalmente en cantidades en el intervalo de 0,1 mM - 20 mM, 0,5 mM 10 mM o 0,75 mM - 5 mM.
- 30 Las condiciones particulares para la retirada al menos parcial de los entrecruzamientos introducidos por la fijación con aldehído y la evaluación de la retirada de los entrecruzamientos de aldehído se describen en Darling et al., Anal. Chem., 86:5678-5681, 2014; y Niranjanakumari S. et al., Methods 2002; 26:182-190.
- 35 La lisis de las células se consigue mediante cualquiera de distintos métodos, incluyendo de manera ilustrativa, la sonicación, o el tratamiento con detergentes.
- Las células del trofoblasto extraveloso fetal se lavan antes de la lisis para retirar al menos parcialmente los entrecruzamientos introducidos por la fijación con aldehído de acuerdo con aspectos de la presente invención.
- 40 Las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas se procesan adicionalmente para aislar el ARN. Dicho procesamiento incluye la lisis de las células del trofoblasto extraveloso fetal y la separación del ADN de las células del trofoblasto extraveloso fetal y las proteínas del ARN. La separación del ADN celular del trofoblasto extraveloso fetal y las proteínas del ARN se consigue mediante cualquiera de distintos métodos, de manera ilustrativa incluyendo, la degradación del ADN celular del trofoblasto extraveloso fetal mediante un tratamiento con DNasa de las células lisadas y/o la degradación de la proteína mediante un tratamiento con proteasa de las células lisadas. Opcionalmente, se incluye una proteasa en la solución de lavado.
- 45
- El ARN se puede entonces purificar adicionalmente para retirar la DNasa y/o proteasa y las proteínas y/o ADN degradados, mediante cualquiera de distintos métodos, que se ejemplifican por la precipitación y lavado.
- 50 De manera alternativa, las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas se lisan y el lisado celular del trofoblasto extraveloso fetal se lava para retirar al menos parcialmente los entrecruzamientos introducidos por la fijación con aldehído de acuerdo con aspectos de la presente invención, se produce un lisado de células del trofoblasto extraveloso fetal lavado.
- 55 La lisis de las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas y el lavado para retirar al menos parte de los entrecruzamientos introducidos por la fijación con aldehído se llevan a cabo simultáneamente de acuerdo con aspectos de la presente divulgación mediante la inclusión de un detergente en la solución de lavado. Se incluye opcionalmente un detergente en la solución de lavado, por ejemplo, en cantidades en el intervalo de un 0,1 - 5 % p/v de la solución de lavado, un 0,25 - 2,5 % p/v o 0,5 - 1,5 % p/v. Los detergentes incluidos se ejemplifican por, pero no se limitan a, SDS, Nonidet P-40, Tween-20 y Triton-X 100. Un ejemplo de solución de lavado para la lisis simultánea es 200 mM de NaCl, 10 mM de Tris- HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA y un 1 % de SDS. Una solución de lavado de ejemplo adicional para la lisis simultánea es 200 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, un 1 % de SDS y una proteasa, tal como una Proteinasa K en el intervalo de 50-1500 microgramos/ml.
- 60
- 65 El lisado de células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas se procesan adicionalmente para aislar el ARN. Dicho procesamiento incluye la separación del ADN celular del trofoblasto extraveloso fetal y las proteínas del ARN. La

- 5 separación del ADN celular del trofoblasto extraveloso fetal y las proteínas del ARN se consigue mediante cualquiera de distintos métodos, de manera ilustrativa incluyendo, normalmente la degradación del ADN celular del trofoblasto extraveloso fetal mediante un tratamiento con DNasa de las células lisadas y/o un tratamiento con proteasa de las células lisadas. La DNasa se utiliza normalmente en cantidades en el intervalo de aproximadamente 50 - 500' unidades Kunitz/mililitro de lisado. El ARN se puede entonces purificar adicionalmente para retirar la DNasa y/o el ADN y las proteínas degradados, mediante cualquiera de distintos métodos, que se ejemplifican por la precipitación, centrifugación y lavado.
- 10 El ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal incluye cualquier ensayo de ácido nucleico aplicable.
- 15 El ARN aislado se utiliza opcionalmente para construir bibliotecas para "secuenciación de próxima generación" generando bibliotecas marcadas con códigos de barras utilizando el kit de preparación de bibliotecas ScriptSeq v2 RNA-Seq (Epicentre).
- 20 El ARN aislado de las células maternas y fetales se pueden secuenciar para identificar productos genéticos en las células maternas y fetales. La comparación de los productos genéticos en diferentes poblaciones de células es útil para identificar puntos en común y diferencias indicativas de la salud, así como patologías del feto y/o la madre asociadas con la gestación tales como preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, parto prematuro y aborto espontáneo.
- 25 El ARN puede transcribirse inversamente en ADNc para el análisis utilizando qPCR. El procedimiento que se desvela en el presente documento se puede utilizar para identificar los genes que se expresan diferencialmente por las células del trofoblasto extraveloso fetal entre las 5 y 20 semanas de gestación en gestaciones con resultados normales, en comparación con gestaciones con resultados adversos (preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, parto prematuro, aborto espontáneo y otros) de acuerdo con aspecto de la presente divulgación. Una vez que se identifica, el ARN aislado se puede utilizar para ensayos de ácido nucleico, tal como RT-PCR cuantitativa para explorar prospectivamente los pacientes para evaluar su riesgo de resultado adverso, por ejemplo.
- 30 Se pueden utilizar métodos de inmunoensayo para ensayar un analito diana, tal como un biomarcador en una muestra, incluyendo, pero no limitado a, ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), ensayo de inmunofiltración ligada a enzimas (ELIFA), citometría de flujo, inmunotransferencia, inmunoprecipitación, inmunoquímica, inmunocitoquímica, inmunoensayo luminiscente (LIA), inmunoensayo fluorescente (FIA), y radioinmunoensayo. Se pueden utilizar métodos de ensayo para obtener resultados cualitativos y/o cuantitativos. Los detalles específicos de los métodos de ensayo adecuados para el ensayo tanto cualitativo como cuantitativo de una muestra se describen en referencias convencionales, que incluyen de manera ilustrativa E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; F. Breitling y-S. Diibel, *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, New York, 1999; H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Basics: From Background to Bench*, BIOS Scientific Publishers, 2000; B.K.C. Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2003; F. M. Ausubel et al., Eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, Wiley, 2002; S. Klussman, Ed., *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, Wiley, 2006; Ormerod, M. G., *Flow Cytometry: a practical approach*, Oxford University Press, 2000; Givan, A. L., *Flow Cytometry: first principles*, Wiley, New York, 2001; Gorczyca, W., *Flow Cytometry in Neoplastic Hematology: morphologic-immunophenotypic correlation*, Taylor & Francis, 2006; Crowther, J. R., *The ELISA Guidebook (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press, 2000; Wild, D., *The Immunoassay Handbook*, 3ª Edición, Elsevier Science, 2005 y J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª Ed., 2001.
- 40 Los anticuerpos y los métodos para preparación de anticuerpos se conocen bien en la técnica. Como se utiliza en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" engloban los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multispecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, anticuerpos de dominio único, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por disulfuro (sdFv), y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulinas y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina son de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), o subclase.
- 55 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "fragmento de anticuerpo" y "fragmento de unión al antígeno" definen un fragmento de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un analito diana. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse por cualquier técnica conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> se pueden producir por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos de anticuerpo también se producen por tecnologías de ADN recombinante.
- 60 Los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, métodos para su generación y métodos para la exploración de los anticuerpos generados sustancialmente en cuanto a la unión específica con un antígeno se conocen en la técnica y

dichos anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno y métodos se describen con mayor detalle, por ejemplo, en Antibody Engineering, Kontermann, R. y Diibel, S. (Eds.), Springer, 2001; Harlow, E. y Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; F. Breitling y S. Dubel, Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, New York, 1999; H. Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation y Use of Monoclonal Antibodies y Engineered Antibody Derivatives, Basics: From Background to Bench, BIOS Scientific Publishers, 2000; Ausubel, F. et al., (Eds.), Short Protocols in Molecular Biology, Wiley, 2002; J. D. Pound (Ed.) Immunochemical Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2ª ed., 1998; B.K.C. Lo (Ed.), Antibody Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2003; y Kohler, G. y Milstein, C, Nature, 256:495-497 (1975). Los anticuerpos para los analitos diana, tal como un biomarcador, se pueden producir en animales, sintetizarse, producirse por métodos recombinantes y/u obtenerse en el mercado.

Se pueden utilizar aptámeros para ensayar un analito diana. El término "aptámero" se refiere a un péptido y/o ácido nucleico que se une sustancialmente de manera específica a una sustancia específica. En el caso de que un aptámero de ácido nucleico, el aptámero se caracteriza por la interacción de unión con una diana distinta del emparejamiento de bases de Watson/Crick o la unión de triple hélice con un segundo y/o tercer ácido nucleico. Dicha interacción de unión puede incluir la interacción de Van der Waals, interacción hidrófoba, enlace de hidrógenos y/o interacciones electrostáticas, por ejemplo. De manera similar, los aptámeros basados en péptidos se caracterizan por la unión específica a una diana en el que el aptámero no es un ligando de origen natural a la diana. Las técnicas para la identificación y generación de aptámeros peptídicos y de ácido nucleico y sus usos se conocen en la técnica como se ha descrito, por ejemplo, en F. M. Ausubel et al., Eds., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, Wiley, 2002; S. Klussman, Ed., The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications, Wiley, 2006; y J. Sambrook y D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª Ed., 2001.

La detección de la unión entre un analito diana presente en la muestra y una pareja de unión se consigue por cualquiera de distintos métodos conocidos en la técnica, que incluye de manera ilustrativa la detección de un marcador detectable directa o indirectamente unida al analito diana o la pareja de unión. El término: "marcador detectable" se refiere a un material capaz de producir una señal indicativa de la presencia del marcador detectable por cualquier método apropiado que incluye de manera ilustrativa el espectroscópico, óptico, fotoquímico, bioquímico, enzimático, eléctrico y/o inmunológico. Ejemplos de marcadores detectables incluyen de manera ilustrativa un resto fluorescente, un resto quimioluminiscente, un resto bioluminiscente, una partícula de electrón denso, una partícula magnética, una enzima, un sustrato, un radioisótopo y un cromóforo.

La identidad de un marcador o marcadores detectables particulares que se utilizan depende del procedimiento de detección que se utilice. Dichos procedimientos de detección se incorporan en formatos de ensayo particulares que incluyen de manera ilustrativa un ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica, ensayo de inmunofluorescencia, cromatografía líquida, citometría de flujo, otros procedimientos de detección conocidos en la técnica o combinaciones de los mismos.

Un ensayo de unión puede incorporar una pareja de unión unida a un soporte. Un soporte con una pareja de unión que se utiliza en un ensayo de unión puede ser sólido o semisólido y puede ser de cualquiera de distintos materiales tales como cristal, silicio, papel, un polímero de origen natural o sintético, tal como el poliestireno, policarbonato, polipropileno, PVDF, nailon, celulosa, agarosa, dextrano, y poliacrilamida o cualquier otro material al que se puede unir establemente la partícula de unión para su uso en un ensayo de unión.

Un soporte que se utiliza puede incluir grupos funcionales para la unión a parejas de unión, tal como, pero sin limitarse a carboxilo, amina, amino, carboxilato, hálido, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido de azufre, óxido de nitrógeno, grupos funciones epoxi y/o tosilo. La unión de parejas de unión a un soporte se consigue por cualquiera de distintos métodos, incluyendo de manera ilustrativa la adsorción y el enlace químico. En un ejemplo, se puede utilizar el clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, química ECD o EDAC, para unir parejas de unión a partículas. Las parejas de unión se pueden enlazar directa o indirectamente al material del soporte, por ejemplo, mediante un enlace con un revestimiento o enlazador dispuesto sobre el soporte. Los grupos funcionales, la modificación de los mismos y la unión de una pareja de unión a un soporte se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en Fitch, R. M., Polymer Colloids: A Comprehensive Introduction, Academic Press, 1997.

Dichos soportes pueden ser en cualquiera de una variedad de formas y maneras que incluyen, pero no se limitan a, placas de microtitulación, pocillos de microtitulación, agujas, fibras, perlas, portaobjetos, chips de silicio y membranas tales como una membrana de nitrocelulosa o PVDF.

Se puede utilizar cualquiera de los distintos métodos para ensayar un analito diana, tal como un biomarcador, como se ha descrito en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía de gases, cromatografía líquida, espectrometría de movilidad iónica, espectrometría de masas, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS o HPLC-MS), espectrometría de movilidad iónica-espectrometría de masas, espectrometría de masas en tándem, cromatografía de gases-espectrometría de masas, espectrometría de masas de desorción/ionización asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF), desorción/ionización láser aumentado por superficie (SELDI) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear, todas las cuales son bien conocidas por el experto.

Opcionalmente, se utiliza un análisis de espectrometría para ensayar una muestra en cuanto a un analito diana tal como un biomarcador. El análisis de masas se puede utilizar en un ensayo de acuerdo con aspectos de la presente divulgación. El análisis de masas se lleva a cabo utilizando, por ejemplo, espectrometría de masas con tiempo de vuelo (TOF) espectrometría de masas con resonancia ciclotrón iónica con transformación de Fourier. Las técnicas de espectrometría de masas se conocen en la técnica y se encuentran descripciones detalladas ejemplares de métodos para el ensayo de proteínas y/o péptidos en Li J., et al., Clin Chem., 48(8): 1296-304, 2002; Hortin, G.L., Clinical Chemistry 52: 1223-1237, 2006; A.L. Burlingame, et al. (Eds.), Mass Spectrometry in Biology and Medicine, Humana Press, 2000; y D.M. Desiderio, Mass Spectrometry of Peptides, CRC Press, 1990.

10 Espectrometría de masas utilizando células aisladas.

Los biomarcadores para resultados adversos de la gestación se habían limitado previamente a los que se pueden detectar en la circulación materna, que en general son proteínas secretadas por la placenta u otros órganos afectados. Las proteínas liberadas por la placenta necesitan alcanzar un cierto umbral (en el 2º y 3º trimestres) para la detección en la sangre materna.

El análisis de espectrometría de masas (MS) de células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas de acuerdo con aspectos de métodos de la presente divulgación proporciona análisis sensibles de un pequeño número de células. Una muestra endocervical materna típica da lugar a 500-2000 células del EVT fetal. Los métodos MS de acuerdo con aspectos de los métodos de la presente divulgación permite el análisis de un pequeño número de células.

Fenotipado de alta resolución utilizando espectrometría de masas

Se describen en el presente documento métodos de ensayo de las células del trofoblasto extraveloso fetal que incluyen la obtención de una muestra endocervical materna de un sujeto gestante; poner en contacto la muestra endocervical materna con un primer anticuerpo, el primer anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el primer anticuerpo no se une a las células maternas de la muestra endocervical materna; poner en contacto la muestra endocervical materna con uno o más anticuerpos adicionales, donde el primer anticuerpo y cada uno de los anticuerpos adicionales está marcado, de manera que se puede distinguir, con diferentes marcadores detectables por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, la nebulización de la muestra endocervical materna para separar las células; y llevar a cabo la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente sobre las células, ensayando de esta manera las células del trofoblasto extraveloso fetal.

Se utiliza la espectrometría de masas dirigida para la detección sensible y cuantitativa de proteínas, péptidos y modificaciones postraduccionales de acuerdo con aspectos de la presente divulgación. Para aumentar la sensibilidad y para cuantificar las proteínas específicas se pueden introducir péptidos en los biomarcadores de espectrometría de masas que se pueden utilizar para cuantificar proteínas en muestras de pequeño tamaño.

Se utiliza opcionalmente "CytoTof" para el fenotipado profundo de proteínas específicas de células del trofoblasto extraveloso fetal de acuerdo con aspectos de la presente divulgación. El "CytoTof" combina la espectrometría de masas y el marcado con anticuerpos de proteínas sobre las células. Los anticuerpos contra dianas específicas se marcan con diferentes isótopos que los hace distinguibles por el procedimiento de espectrometría de masas. Las células que se van a ensayar se marcan con anticuerpos, se nebulizan, y se mide el tiempo de vuelo de cada masa/anticuerpo marcado con un metal y se cuantifica. Esta estrategia hace posible analizar hasta 100 marcadores sobre una única célula. En este método las células del trofoblasto extraveloso fetal no necesitan purificarse. La positividad de HLA-G se puede utilizar como un identificador en el procedimiento de fenotipado profundo y de alta resolución de una única célula.

Referencias

Las referencias adecuadas para los ensayos son bien conocidas en la técnica y la referencia utilizada puede ser cualquier referencia apropiada.

En un ejemplo, una referencia es un resultado de un ensayo de un biomarcador en una muestra comparable de un animal de control.

Una referencia puede ser un nivel de referencia del uno o más biomarcadores determinados previamente en una muestra de un animal de control individual o en una población de animales de control y se almacena en un medio impreso o electrónico para retomarlo y compararlo con un resultado de un ensayo del uno o más biomarcadores en un animal al que se administra un compuesto de ensayo.

Una referencia puede ser un resultado de un ensayo de uno o más biomarcadores en una muestra comparable de un animal en un momento diferente. Por ejemplo, una referencia puede ser el resultado de un ensayo de uno o más biomarcadores en una muestra comparable obtenida del mismo animal en un momento diferente, antes o después de la administración del compuesto de ensayo. Se puede obtener una primera muestra de un animal individual en un primer momento para obtener un nivel basal específico del animal del uno o más biomarcadores en la primera muestra.

5 Se puede obtener una segunda muestra del animal individual en un segundo momento y se ensaya en cuanto al uno o más biomarcadores para controlar las diferentes en los niveles del uno o más biomarcadores en comparación con la primera muestra. Se pueden obtener muestras adicionales del animal en momentos adicionales y se ensaya en cuanto al uno o más indicadores para controlar las diferentes en los niveles del uno o más indicadores en comparación con la primera muestra, la segunda muestra u otras muestras.

10 Una referencia puede ser un nivel medio de uno o más biomarcadores en muestras comparables obtenidas de una o más poblaciones. El "nivel medio" se determina mediante el ensayo de uno o más indicadores en muestras comparables obtenidas de cada animal de la población. La expresión "muestra comparable" se utiliza para indicar que las muestras son del mismo tipo, es decir, cada una de las muestras comparables es una muestra de suero, por ejemplo.

15 Una diferencia detectada en los niveles de expresión de uno o más biomarcadores en los ensayos de la presente divulgación en comparación con una referencia puede ser un aumento o disminución del nivel o expresión del uno o más biomarcadores. La magnitud de aumento o disminución puede ser, por ejemplo, de al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o más del nivel de referencia.

20 Los resultados de los ensayos se pueden analizar utilizando el análisis estadístico mediante cualquiera de los distintos métodos, ejemplificados por ensayos paramétricos o no paramétricos, análisis de varianza, análisis de covarianza, regresión logística de análisis multivariado, ensayo exacto de Fisher, ensayo chi cuadrado, ensayo T de Student, ensayo de Mann-Whitney, ensayo de rangos firmados de Wilcoxon, ensayo de McNemar, ensayo de Friedman y ensayo de tendencia L de Page. Estos y otros ensayos estadísticos son bien conocidos en la técnica como se detalla en Hicks, CM, Research Methods for Clinical Therapists: Applied Project Design and Analysis, Churchill Livingstone (publicador); 5ª Ed., 2009; y Freund, RJ et al., Statistical Methods, Academic Press; 3ª Ed., 2010.

25 Los ensayos descritos en el presente documento son opcionalmente ensayos de uno o más biomarcadores que se expresan en las células del trofoblasto extraveloso fetal. Por ejemplo, uno o más de galectina 13 (LGALS13, conocido como PP13), galectina 14 (LGALS14), factor de crecimiento placentario (PGF), proteína A plasmática asociada a gestación (PAPPA), proteína fetal alfa (AFP), endoglina (ENG), o tirosina cinasa 1 relacionada (FLT-1) se ensayan para detectar los cambios indicativos de función placentaria anormal tal como preeclampsia, restricción de crecimiento uterino, aborto espontáneo y parto prematuro.

30 Los ensayos descritos en el presente documento son opcionalmente ensayos de uno o más biomarcadores que se expresan en las células del trofoblasto extraveloso fetal de un feto de una gestación del primer y segundo trimestre tal como uno o más de galectina 13 (LGALS13 conocido como PP13), galectina 14 (LGALS14), factor de crecimiento placentario (PGF), proteína A plasmática asociada a gestación (PAPPA), Proteína fetal alfa (AFP), endoglina (ENG), o tirosina cinasa 1 relacionada con fms (FLT-1).

35 Las realizaciones de los métodos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no se consideran limitantes del alcance de los métodos inventivos.

## Ejemplos

### 45 Ejemplo 1

Aislamiento de células del trofoblasto extraveloso fetal no fijadas y aislamiento de del ADN de las células del trofoblasto extraveloso fetal no fijadas

50 Se recolectó una muestra endocervical materna utilizando un cytobrush y el cytobrush se aclaró en medio de cultivo enfriado en hielo o PBS (137 mM de NaCl, 10 mM de tampón de fosfato).

55 Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 10 ml de PBS más 2,7 Mm de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> calentados a temperatura ambiente.

Se preparó la DNasa I disolviendo 1 mg de DNasa I en polvo (Worthington Cat n.º 2138, >2000 unidades Kunitz/mg) en 10 ml de PBS más 0,9 mM de MgCl<sub>2</sub>.

60 Se añadió una alícuota de 100 µl de solución de DNasa a las células y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron entonces tres veces con 10 ml de PBS que contenía 30 mM de EDTA y luego se llevaron a cabo dos lavados adicionales con PBS.

65 Las células se centrifugaron a través de un filtro de 250 micrómetros y se resuspendieron en 10 ml de PBS a 4 °C. Las células se lavaron entonces 2 veces más en 10 ml de PBS y el aglomerado final se lleva a un volumen de 1 ml en PBS.

El procedimiento de separación magnética para la retirada de células fetales comienza con la adición de 20 µl de

nanopartículas magnéticas de 250 nm conjugadas con un anticuerpo anti-HLA-G se añaden a las células lavadas después de la resuspensión en 1 ml de PBS y la incubación a 4 °C durante 1 a 24 horas con agitado.

5 Las células maternas (negativas a HLA-G) se separan de las células del trofoblasto extraveloso fetal magnetizadas (positivas a HLA-G) utilizando un imán DynaMag™ Spin (Life Technologies).

Las células del trofoblasto extraveloso fetal se lavan entonces 3 veces utilizando un imán para retirar las células maternas restantes.

10 Las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas se resuspenden en una solución de 50-100 microlitros de PBS/10 mM de EDTA. Opcionalmente, las células maternas aisladas se resuspendieron en una solución de 50-100 microlitros de PBS/10 mM de EDTA. Se retiró una alícuota de 15 microlitros para el recuento celular y el control de calidad para las células fetales y opcionalmente las células maternas si se desea.

15 Se utilizaron alícuotas de 50 microlitros cada una de células maternas aisladas y células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas para el aislamiento de ADN.

20 Se añadieron alícuotas de 25 microlitros de tampón de extracción de ADN concentrado 3x (90 mM de TRIS, 90 mM de EDTA, un 1,5 % de EDTA, pH 8,0, 3 mg/ml de Proteinasa K) se añadieron a 50 microlitros de las células maternas aisladas o células del trofoblasto extraveloso para el aislamiento del ADN. Estas mezclas se incuban entonces durante 3 h a 65 °C, seguido por 10 min a 95 °C. El ADN extraído se congela para los ensayos de PCR o pueden ser para la purificación adicional por centrifugación a alta velocidad en una microcentrífuga durante 5 minutos. Opcionalmente el ADN está purificado adicionalmente, por ejemplo, utilizando kits comerciales de concentración y purificación de ADN, tal como el kit de concentración Zymresearch DNA 10. Se pueden utilizar Pico green o reactivos similares para la  
25 cuantificación de ADN.

Las células no fijadas se incubaron con o sin DNasa sea sobre perlas o en solución. Las células recientes tratadas con DNasa soluble daban como resultado un promedio de producción de 3-6 ng de ADN total.

30 La purificación de ADN de bajas cantidades de ADN con el kit de concentración de Zymresearch DNA daban lugar a una pérdida de un 30-50 % de ADN. De media se aislaron 2-4 ng de ADN puro de alta calidad de una única muestra de material endocervical materno recuperado con un cytobrush.

## 35 Ejemplo 2

Aislamiento de células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas y aislamiento de del ADN de las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas

40 Se recolectó una muestra endocervical materna utilizando un cytobrush insertando aproximadamente 2 cm en el canal endocervical y rotando 2 o 3 veces y se retira. La mucosidad presente en el canal también se recolecta en el cepillo. El cytobrush se aclara en fijador, por ejemplo, utilizando un kit ThinPrep. El espécimen se almacenó refrigerado o a temperatura ambiente y se transportó al laboratorio para un procesamiento adicional. Se puede almacenar a 4 °C durante al menos una semana sin perder ARN o proteína HLA-G.

45 Para aislar las células del trofoblasto extraveloso fetal y opcionalmente células maternas, se lavaron todas las células dos veces con PBS después de la acidificación de la muestra endocervical materna añadiendo 0,6 ml de ácido acético hasta el volumen de 20 ml de ThinPrep que contenían las células, consiguiendo una concentración final de un 3 % de ácido acético.

50 Las células se centrifugaron a través de un filtro de 250 micrómetros y se resuspendieron en 10 ml de PBS a 4 °C. Las células se lavaron entonces 2 veces más en 10 ml de PBS y el aglomerado final se lleva a un volumen de 1 ml en PBS.

55 Para proteger el ADN nuclear de la degradación por nucleasas que entran en la célula fijada permeable, se une la DNasa, tal como por un enlace covalente a uno o más soportes tales como perlas o partículas que no puedan penetrar en las células fijadas. En este ejemplo, la DNasa unida covalentemente a perlas no magnéticas se añade a las células, 5 microlitros de F7 (MoBiotec, Alemania), y se incuban durante 10 min a temperatura ambiente.

60 El procedimiento de separación magnética para retirar las células fetales comienza por 1 h a 24 h de agitado, como se ha descrito en Bolnick et al., Fertil. Steril., 102:135-142.e6, 2014.

Las células maternas (negativas a HLA-G) se separan de las células del trofoblasto extraveloso fetal magnetizadas (positivas a HLA-G) utilizando un imán DynaMag™ Spin (Life Technologies).

65 Las células del trofoblasto extraveloso fetal se lavaron entonces 3 veces en PBS con 30 mM de EDTA.

Opcionalmente, las células maternas se purifican utilizando una malla de 15 micrómetros, las células se lavan entonces

y se concentran.

5 Las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas se resuspenden en una solución de 50-100 microlitros de PBS/10 mM de EDTA. Opcionalmente, las células maternas aisladas se resuspendieron en una solución de 50-100 microlitros de PBS/10 mM de EDTA. Se retiró una alícuota de 15 microlitros para el recuento celular y el control de calidad para las células fetales y opcionalmente las células maternas si se desea.

10 Se añadieron alícuotas de 25 microlitros de tampón de extracción de ADN concentrado 3x (90 mM de TRIS, 90 mM de EDTA, un 1,5 % de EDTA, pH 8,0, 3 mg/ml de Proteinasa K) se añadieron a 50 microlitros de las células maternas aisladas o células del trofoblasto extraveloso para el aislamiento del ADN. Estas mezclas se incuban entonces durante 3 h a 65 °C, seguido por 10 min a 95 °C. El ADN extraído se congela para los ensayos de PCR o pueden ser para la purificación adicional por centrifugación a alta velocidad en una microcentrífuga durante 5 minutos. Opcionalmente el ADN está purificado adicionalmente, por ejemplo, utilizando kits comerciales de concentración y purificación de ADN, tal como el kit de concentración Zymresearch DNA 10. Se pueden utilizar Pico green o reactivos similares para la cuantificación de ADN.

20 Las células fijadas se incubaron con o sin DNasa sea sobre perlas o en solución. Las células fijadas maternas o fetales (500-1500) tratadas con DNasa I unida a perlas daban como resultado un promedio de producción de 3-6 ng de ADN total.

La purificación de ADN de bajas cantidades de ADN con el kit de concentración de Zymresearch DNA daban lugar a una pérdida de un 30-50 % de ADN. De media se aislaron 2-4 ng de ADN puro de alta calidad de una única muestra de material endocervical materno recuperado con un cytobrush.

### 25 Ejemplo 3

Aislamiento de ARN de células del trofoblasto extraveloso fetal

30 Se recolectó una muestra endocervical materna utilizando un cytobrush insertando aproximadamente 2 cm en el canal endocervical y rotando 2 o 3 veces y se retira. La mucosidad presente en el canal también se recolecta en el cepillo. El cytobrush se aclara en fijador, por ejemplo, una solución de metanol tampón. El espécimen se almacenó refrigerado o a temperatura ambiente y se transportó al laboratorio para un procesamiento adicional. Se puede almacenar a 4 °C durante al menos una semana sin perder ARN o proteína HLA-G.

35 Para aislar el ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal, se lavaron todas las células dos veces con PBS después de la acidificación de la muestra endocervical añadiendo 0,6 ml de ácido acético hasta el volumen de 20 ml de la solución de metanol tampón que contenía las células, consiguiendo una concentración final de un 3 % de ácido acético.

40 Las células se centrifugaron a través de un filtro de 250 micrómetros, se retiró el sobrenadante, y el aglomerado celular se resuspendió rápidamente en un 4 % de paraformaldehído/PBS durante 10 min antes de aglomerar de nuevo las células y el lavado de las células con PBS o tampón Tris. La fijación con formaldehído evita la pérdida de ácidos nucleicos altamente solubles e inactiva eficazmente las RNAsas endógenas.

45 Las células del trofoblasto extraveloso fetal positivas a HLA-G se retiraron mediante aislamiento inmunomagnético, incluyendo la etapa de incubación de las células con anticuerpo anti-HLA-G fijado a las perlas magnéticas como se describe en Bolnick et al., Fertil. Steril., 102:135-142.e6, 2014 y las células maternas (negativas a HLA-G) se separaron de las células del trofoblasto extraveloso fetal magnetizadas (positivas a HLA-G) utilizando un imán DynaMag™ Spin (Life Technologies).

50 Las células del trofoblasto extraveloso fetal se lavaron entonces 3 veces en PBS con 30 mM de EDTA.

55 Después del aislamiento inmunomagnético de las células del trofoblasto extraveloso fetal, se desentrecruzaron antes del aislamiento del ARN mediante la incubación en 200 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA y un 1 % de SDS y 1300 ng/ml de Proteinasa K a 56 °C durante 15 min y a 80 °C durante 15 min. El lisado se trató entonces con 180 unidades Kunitz de DNasa/mililitro para retirar el ADN después del lavado. El ARN del lisado se purificó entonces utilizando una columna de centrifuga y se eluyó con agua libre de RNAsas. El ARN aislado se cuantificó y evaluó en cuanto a su pureza con el Analizador de Electroforesis Microfluidica Agilent 2100, utilizando el Kit RNA Pico (Agilent Technologies).

60 El tratamiento con DNasa opcional antes de la lisis celular eliminaba la contaminación con ADN antes de la extracción de ARN, que se fragmentaba durante el desentrecruzamiento.

65 El ARN aislado se cuantificó y su pureza se evaluó con el Analizador de Electroforesis Microfluidica Agilent 2100, utilizando el Kit RNA Pico (Agilent Technologies). La calidad del ARN fragmentado se validó con una PCR en tiempo real semicuantitativa utilizando el ciclador térmico CFX384 BioRad (Life Technologies). La recuperación de 19

especímenes endocervicales maternos se evaluó como se muestra en la Fig. 1 y se muestran los valores de Ct de la qPCR de cuatro ARN de cantidad diferente conocida en la Fig. 2 para el espécimen ThinPrep en bruto, las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas y las células maternas sin células del trofoblasto extraveloso fetal. En la Fig. 2, se ensayó el ADNc fabricado a partir de cantidades iguales de ARN mediante qPCR con los cebadores para el rARN o ARNm indicados. Las cantidades de ARN recuperadas en las células del trofoblasto extraveloso fetal y los aislados maternos eran comparables al espécimen cervical en bruto sin fraccionar. El ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas (EVT) se comparó con el ARN aislado de la muestra materna que no necesitaba una fijación con aldehído ya que las células se utilizaron directamente sin aislamiento de EVT. Aunque el análisis mostraba que el ARN de los aislados estaba altamente fragmentado, producía valores de Ct comparables a las células en bruto cuando se ensayaban cantidades de ARN equivalentes por qPCR para cuatro ARN diferentes. Se descubrió que se recuperaban aproximadamente 50 ng de ARN útil utilizando esta estrategia. El aislamiento de ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal aisladas de acuerdo con la presente invención generaban cantidades adecuadas de ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal para el análisis mediante qPCR.

El ARN aislado se utilizó entonces para construir bibliotecas para secuenciación de ARN generando bibliotecas marcadas con códigos de barras utilizando el kit de preparación de bibliotecas ScriptSeq v2 RNA-Seq (Epicentre) (Fig. 3). El ARN aislado de las células fetales y maternas en un único espécimen se secuenciaron por triplicado en un secuenciador Genome Analyzer II de Illumina. Después de la secuenciación, los datos del ARN se sometieron a software de desmultiplexado. Los datos de secuenciación se alinearon con la construcción de genoma humano (HG19) y con las secuencias ribosómicas, 18s y 28s, utilizando la herramienta bioinformática Novoalign. Se obtuvo un 95 % de alineamiento, sugiriendo el éxito de la preparación de la biblioteca de ARN y el desmultiplexado. Se identificaron más de 20.000 productos genéticos se identificaron en cada espécimen. Las lecturas generadas de esta manera se convirtieron a archivos .bed y se importaron en la estación de mapeo Genomatix (GMS). La GMS generó los datos en forma de RPKM (lecturas por kilobases de exón por millón de fragmentos mapeados) para los 25.000 genes de la base de datos. La comparación de los valores de RPKM entre las muestras presentaba un estrecho alineamiento entre las muestras maternas o las muestras fetales, pero se apartaban claramente cuando se alineaban las muestras fetal y materna. Los ejemplos de cada comparación se muestran en las Fig. 4A-4C. Utilizando el ARN obtenido mediante entrecruzamiento de células EVT con paraformaldehído durante su aislamiento, se generaron datos de alta calidad mediante el análisis de secuenciación de próxima generación.

#### Ejemplo comparativo 4

Para el perfil del proteoma profundo en poblaciones celulares raras, un análisis multiplexado de acuerdo con aspectos de la presente divulgación incorpora una muestra de referencia de la línea celular del citotrofoblasto (HTR) estrechamente relacionada HTR-8/SVneo. Cada canal de la muestra contiene de 100 a 1000 células. La señal para la selección de iones en MS1 y la secuenciación de los iones en MS2 son aditivos, proporcionando la amplificación de las señales de los péptidos en las muestras de 100 células en combinación con las otras muestras multiplexadas. La selección de Precursor Sincronizado (SPS) en la que 10 iones MS2 se combinan para generar un espectro MS3 para la cuantificación, se utilizó para aumentar la especificidad y sensibilidad como se ha descrito en Ting et al., Nat Methods 2011; 8: 937-940; y McAlister et al., Anal Chem 2012; 84: 7469-7478. Esta asignación y cuantificación relativa de las proteínas para las muestras individuales se produce en los espectros MS3, como se ilustra en las Fig. 5A-5C, que muestra un espectro MS2 (Fig. 5A) y el espectro MS3 de cuantificación correspondiente (Fig. 5B-5C). Aquí, las células del trofoblasto se dividieron en alícuotas de 1000, 500, 250 o 100 células por tubo. Las células se lisaron con detergente ProteaseMaz, un detergente adecuado para espec. de masas que no necesita retirarse de la muestra. Las células lisadas se digirieron con Tripsin/Lys-C después de reducirse y alquilarse a concentraciones mínimas de TCEP y yodoacetamida (IAA). Después la digestión durante una noche, los péptidos se marcaron con suficiente reactivo TMT10plex (Thermo Scientific) para 5 microgramos de proteína. Los péptidos marcados se agruparon, concentraron mediante Speed-Vac y se procesaron directamente en un Orbitrap fusión utilizando SPS para adquirir el espectro de cuantificación. La cuantificación de las muestras celulares más pequeñas se determinó por la relación de señal en comparación con el canal '126' que contenía 1000 células. Las relaciones eran: 0,99, 1,031 y 1,031 para las tres otras muestras de 1000 células; 0,523 y 0,559 para las muestras de 500 células; 0,226 y 0,232 para las muestras de 250 células y 0,124 y 0,141 para las muestras de 100 células (Fig. 5C). En un gradiente de 90 min desde un 2 a un 30 % de acetonitrilo se identificaron y cuantificaron 931 proteínas que representaban un amplio intervalo de orgánulos celulares y actividades bioquímicas. Todas las proteínas que se identificaron se cuantificaron en los 10 canales indicando que se hizo el perfil de muestras de 100 células a la misma profundidad que las muestras de 1000 células. Nótese que había una representación prominente de 109 proteínas en las categorías de Reproducción y Proceso Reproductivo, como sería de esperar para las células del trofoblasto. Estos datos representan un importante logro en el perfil cuantitativo del proteoma de poblaciones celulares raras. Los mismos procedimientos se utilizan en el análisis de las células del trofoblasto extraveloso fetal para identificar diferencias entre las cohortes de pacientes.

#### Ejemplo comparativo 5

Biomarcadores para preeclampsia (PE) y restricción del crecimiento intrauterino (IUGR).

Aislamiento de células de acuerdo con el ejemplo

La exploración de las células del trofoblasto extraveloso fetal obtenido de gestaciones en el primer y segundo trimestre mediante inmunocitoquímica semicuantitativa revelaron que estaban alteradas siete proteínas asociadas con preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino, la galectina 13 (LGALS13, conocida como PP13), galectina 14 (LGALS14), factor de crecimiento placentario (PGF), proteína A plasmática asociada a gestación (PAPPA), proteína fetal alfa (AFP), endoglina (ENG), o tirosina cinasa 1 relacionada con fms (FLT-1). Específicamente, tres proteínas aumentaban (AFP, FLT-1, ENG) y cuatro proteínas disminuían (PAPPA, PGF, LGALS13, LGALS14) en las gestaciones que desarrollaban más tarde preeclampsia o restricción del crecimiento intrauterino, mientras que los niveles de queratina-7 (KRT7) eran similares en ambos grupos (Fig. 6). Los registros médicos se revisaron para seleccionar especímenes archivados para el análisis de gestaciones con un resultado normal (N = 20) o que desarrollaron insuficiencia uteroplacentaria (preeclampsia o restricción del crecimiento intra uterino; N = 12). Los especímenes se obtuvieron mediante TRIC con una edad gestacional (GA) similar ( $p = 0,34$ ), que variaba entre 5 a 20 semanas (GA media = 10,9 semanas para los normales, 12,7 semanas para PE/IUGR). Las intensidades de fluorescencia de las células individuales se semicuantificaron utilizando inmunocitoquímica y análisis de imágenes (Simple PCI, Hamamatsu), como se describe en Wang et al., Dev Biol 2007; 302: 143-153; y Rout et al., Dev Biol 2004; 268: 135-151. Se tituló cada uno de los anticuerpos para asegurar una señal de fluorescencia lineal con el marcado. Se evaluaron los portaobjetos juntos con los mismos lotes de anticuerpos, utilizando tiempos de exposición de la cámara similares para optimizar la cuantificación de la señal. Se determinaron las medias de 10 células, restando la tinción de fondo producida por IgG no inmunitaria. La KRT7 que no cambiaba (Fig. 6), proporcionaba un control para las varianzas no específicas. Se descubrieron diferencias significativas (por ensayos T, ajustados para varianzas iguales y desiguales) de la expresión entre las cohortes normal y PE/IUGR para cada una de las supuestas proteínas biomarcadoras (Fig. 6). No había correlación entre la intensidad de tinción y la GA dentro de la cohorte normal, aunque la potencia era probablemente inadecuada. Las curvas de eficacia diagnóstica (Receiver Operating Characteristic, ROC) construidas para cada proteína tenían áreas bajo la curva (AUC) como se muestran en la Tabla I a continuación.

Biomarcador	AUC	Corte	Tendencia en Adverso
LGALS13	0,75	17,54	Valor menor
LGALS14	0,80	27,4	Valor menor
PAPPA	0,78	15,47	Valor menor
PGF	0,82	18,73	Valor menor
AFP	0,88	17,45	Valor mayor
FLT1	0,78	21,12	Valor mayor
ENG	0,77	14,02	Valor mayor

**Ejemplo comparativo 6**

Biomarcadores de aborto espontáneo y parto prematuro.

Se analizaron las células del trofoblasto extraveloso fetal recolectadas en el primer y segundo trimestre de 8 pacientes con abortos espontáneos conocidos y 13 pacientes con gestaciones a término sin complicaciones mediante inmunocitoquímica cuantitativa, utilizando un panel de 7 proteínas AFP, FLT1, ENG, PAPPA, PGF, LGALS 13 y LGALS14. La edad gestacional media era de 7,2 semanas en los pacientes de aborto espontáneo y de 10,9 en los pacientes de control. Se veía una elevación significativa de ENG, Fit-1, y AFP y una disminución significativa de LGALS14 en los pacientes de aborto espontáneo vs. los pacientes de control (Tabla II). La expresión proteica anormal es aparente temprano en la gestación en las células del trofoblasto extraveloso fetal en los pacientes de aborto espontáneo.

La Tabla II detalla la expresión de biomarcadores proteicos en pacientes con resultados de gestación normales (Control) y pacientes que tenían aborto espontáneo. Se muestran las intensidades de fluorescencia medias  $\pm$  SEM, y los valores de P derivados de los ensayos t que se llevaron a cabo para cada proteína para comparar los grupos de control y de pacientes con aborto espontáneo.

	ENG	FLT-1	AFP	LGALS14
Control	20,44 $\pm$ 5,61	18,50 $\pm$ 4,05	11,68 $\pm$ 1,93	54,77 $\pm$ 6,71
Aborto espontáneo	70,71 $\pm$ 14,60	79,27 $\pm$ 15,01	52,23 $\pm$ 5,94	38,19 $\pm$ 5,33
Valor de P	0,009	0,001	<0,001	0,02

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de ensayo del ARN de las células del trofoblasto extraveloso fetal, que comprende:
- 5 proporcionar una muestra endocervical materna obtenida de un sujeto gestante;  
 fijar las células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con un fijador de aldehído que produce  
 células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído;  
 retirar las células del trofoblasto extraveloso fetal de la muestra endocervical materna, produciendo células del  
 trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído aisladas;  
 10 lavar las células del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído aisladas o lavar un lisado de las células del  
 trofoblasto extraveloso fetal fijadas con aldehído aisladas para promover la retirada de los entrecruzamientos  
 introducidos por el fijador de aldehído, produciendo células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas o un lisado  
 lavado;  
 15 extraer el ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal de las células del trofoblasto extraveloso fetal lavadas o el  
 lisado lavado; y  
 ensayar el ARN celular del trofoblasto extraveloso fetal para determinar una o más características del ARN celular  
 del trofoblasto extraveloso fetal;
- 20 donde el tratamiento con el fijador de aldehído se lleva a cabo antes de la retirada de las células del trofoblasto  
 extraveloso fetal de la muestra endocervical materna.
2. El método de la reivindicación 1, donde la muestra endocervical materna se fija inmediatamente después de obtener  
 la muestra del sujeto gestante.
- 25 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la muestra endocervical materna está fijada:
- (a) en un fijador alcohólico inmediatamente después de obtener la muestra del sujeto gestante y antes de fijar las  
 células del trofoblasto extraveloso fetal mediante el tratamiento con el fijador de aldehído que produce las células  
 del trofoblasto extraveloso fetal fijadas en aldehído; o  
 30 (b) mediante el tratamiento con el fijador de aldehído inmediatamente después de la obtención de la muestra del  
 sujeto gestante.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el ensayo del ARN celular del trofoblasto extraveloso  
 fetal comprende la secuenciación, PCR, PCR cuantitativa, PCR en tiempo real o una combinación de dos o más de las  
 35 mismas.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el sujeto gestante es un ser humano.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la retirada de las células del trofoblasto extraveloso fetal  
 de la muestra endocervical materna comprende poner en contacto las células del trofoblasto extraveloso fetal con un  
 anticuerpo específico para las células del trofoblasto extraveloso fetal, donde el anticuerpo no se une a las células  
 40 maternas de la muestra endocervical materna.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el anticuerpo específico para las células del trofoblasto  
 extraveloso fetal está unido a un soporte.  
 45
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde ni la Proteína A ni la Proteína G están unidas al soporte.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el soporte es una pluralidad de partículas magnéticas.  
 50
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la retirada de las células del trofoblasto extraveloso  
 fetal de la muestra endocervical materna comprende la exposición de las partículas magnéticas a un imán.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la muestra endocervical materna no está tratada con  
 55 un agente mucolítico.

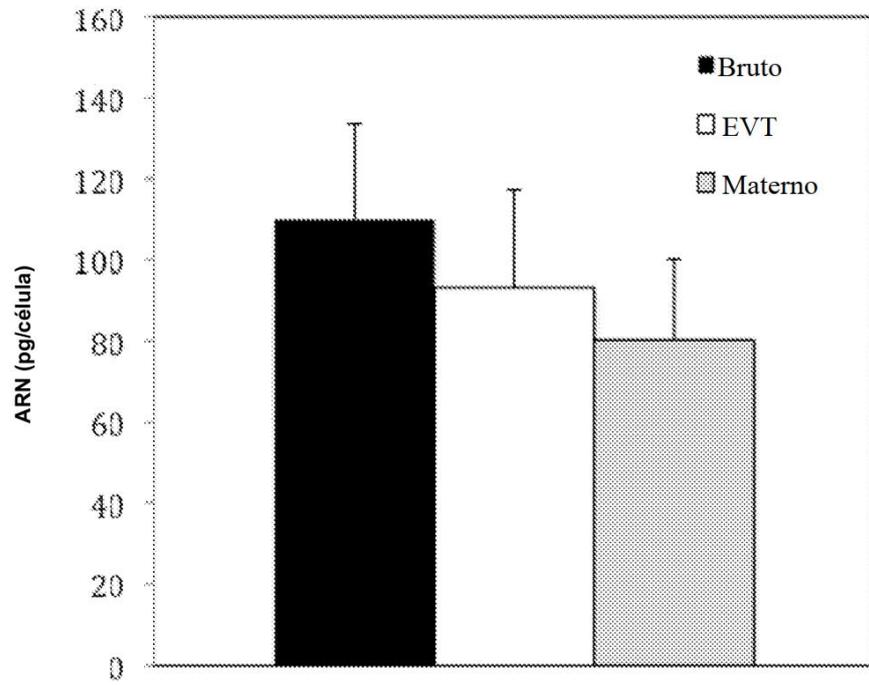


FIG. 1

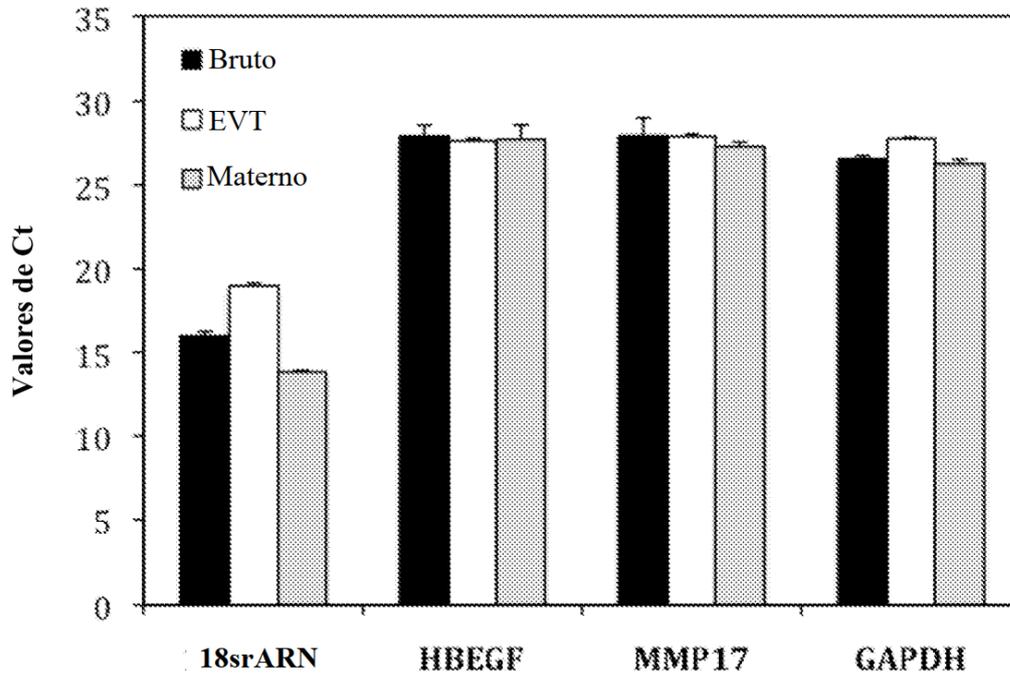


FIG. 2

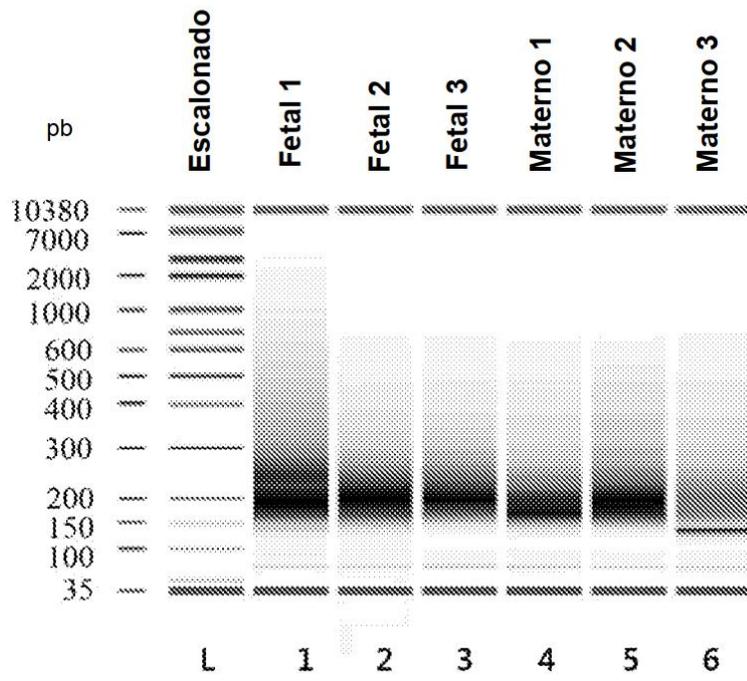


FIG. 3

Mat1 vs Mat2

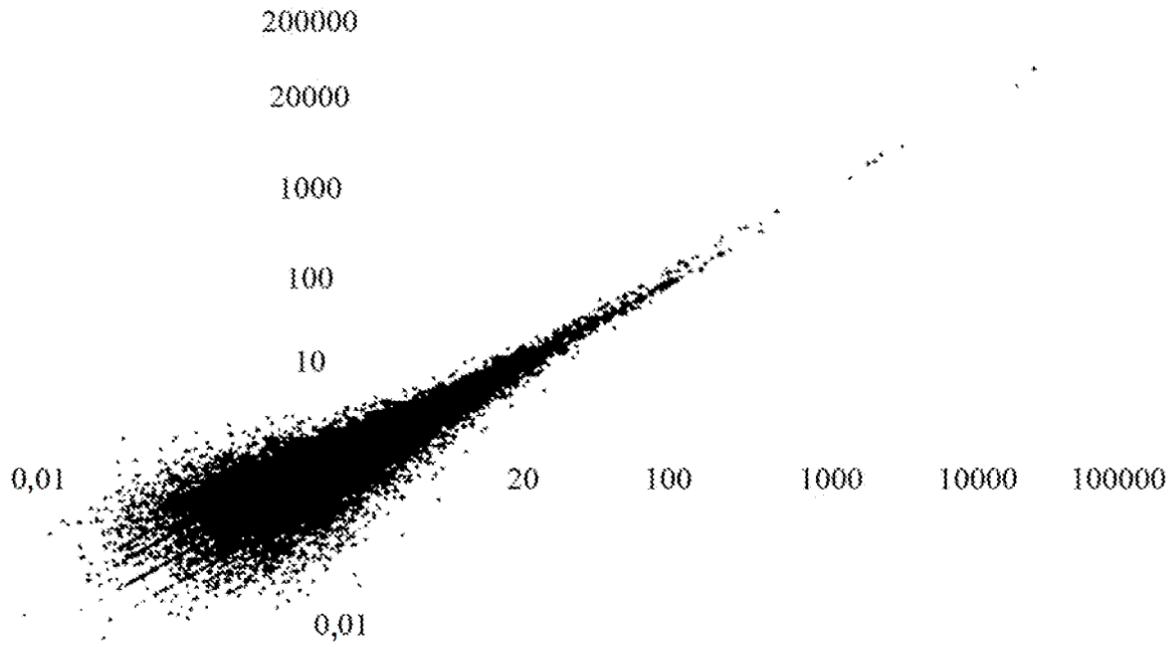


FIG. 4A

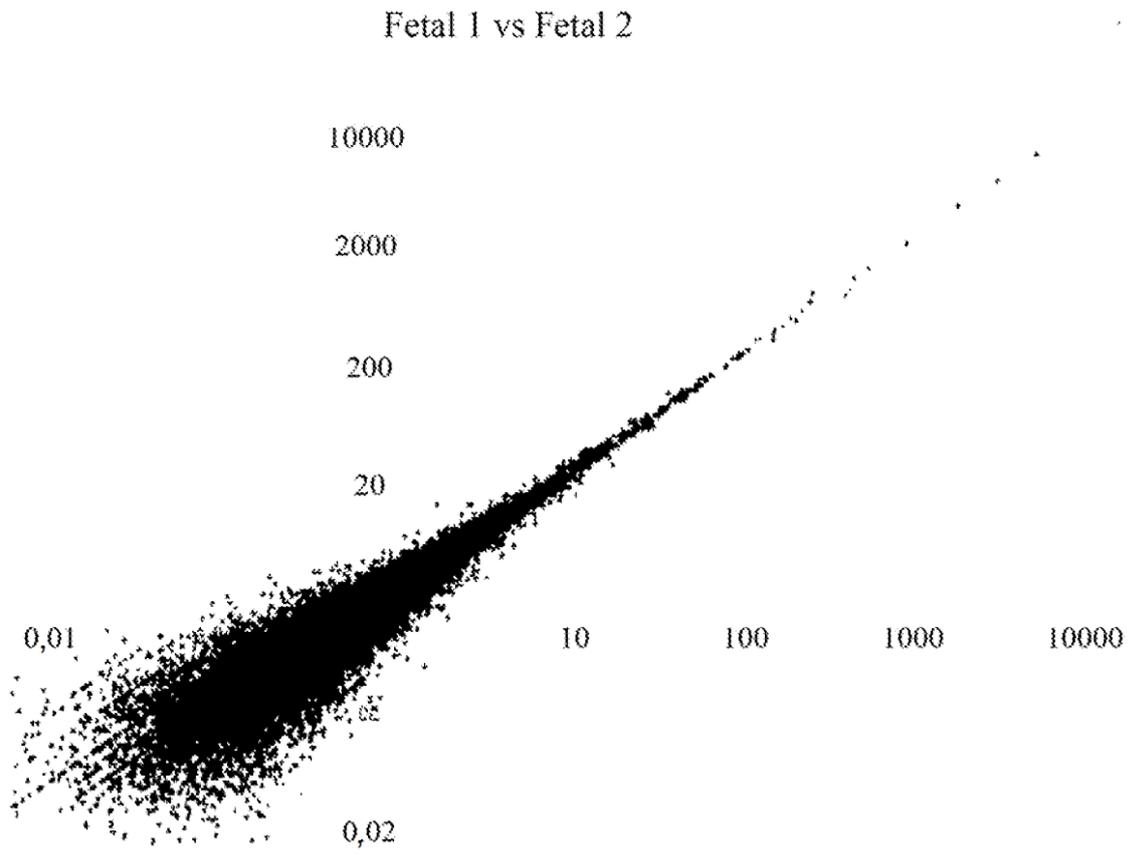
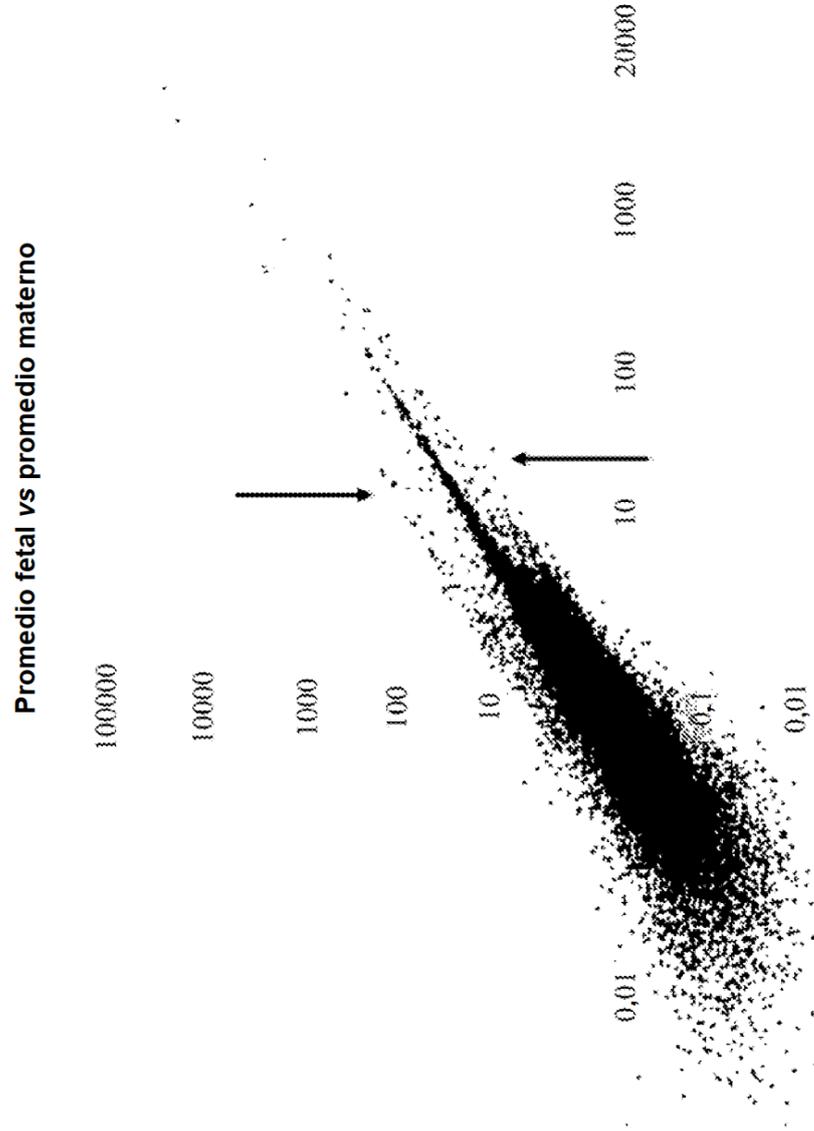


FIG. 4B

FIG. 4C



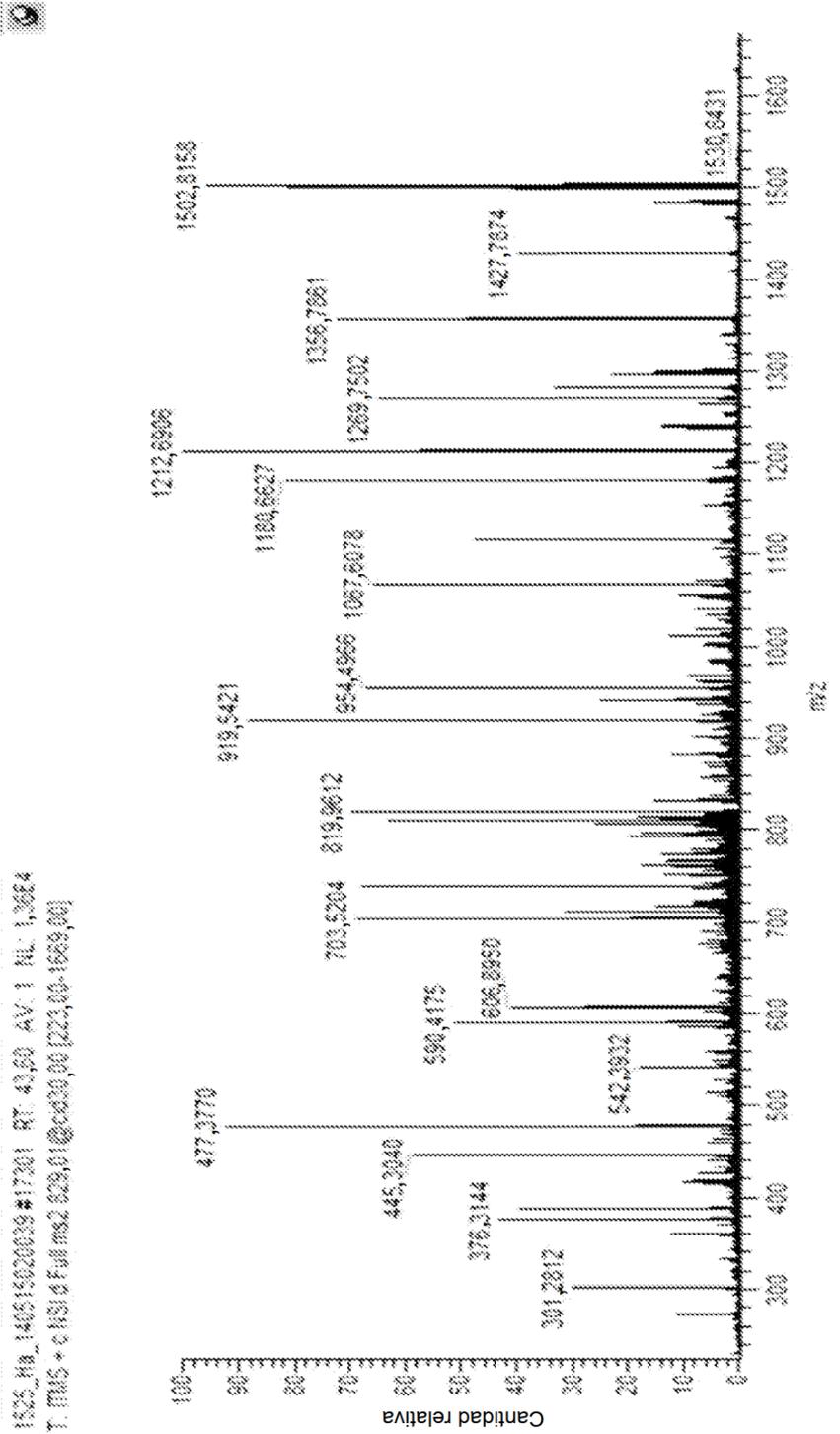


FIG. 5A

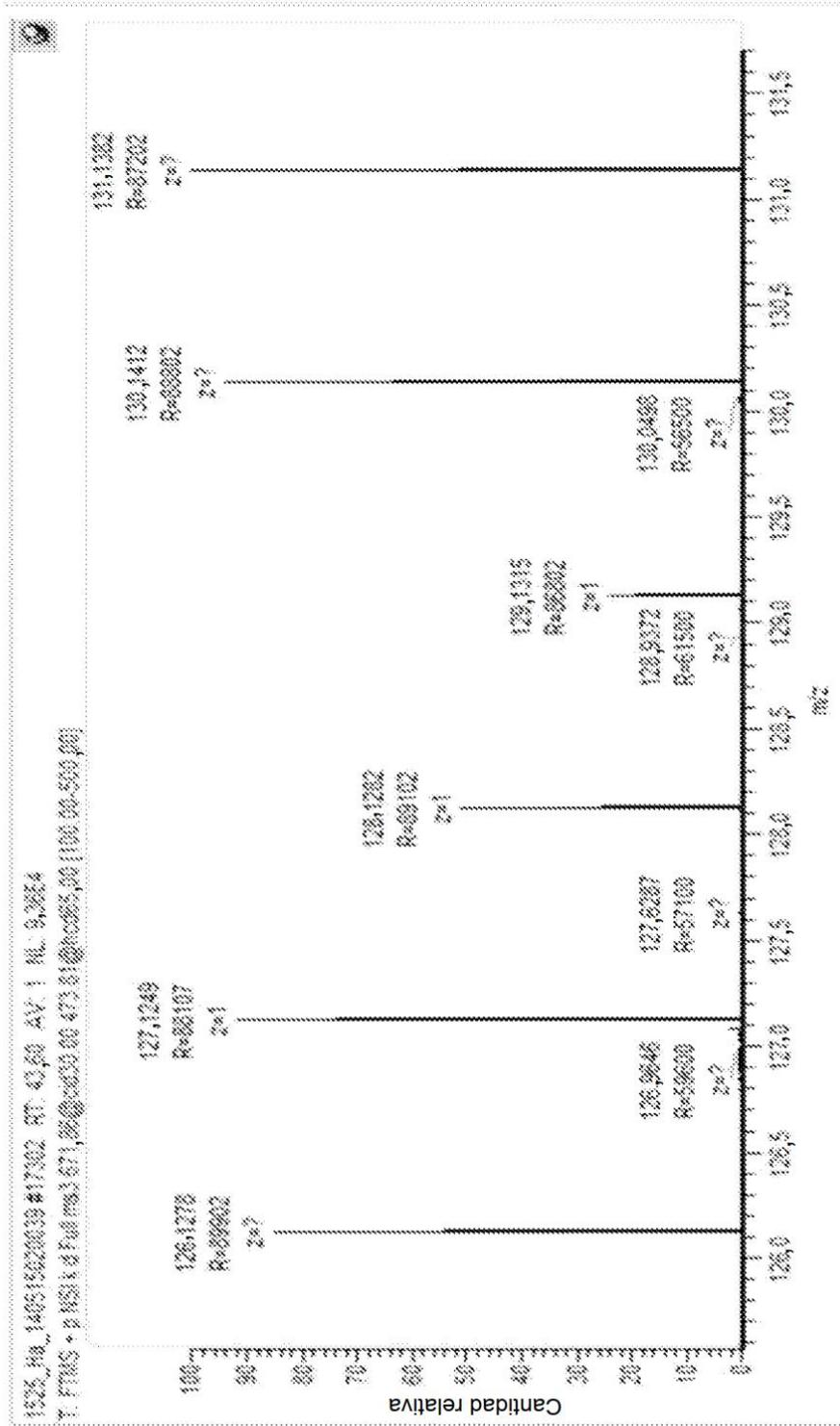


FIG. 5B

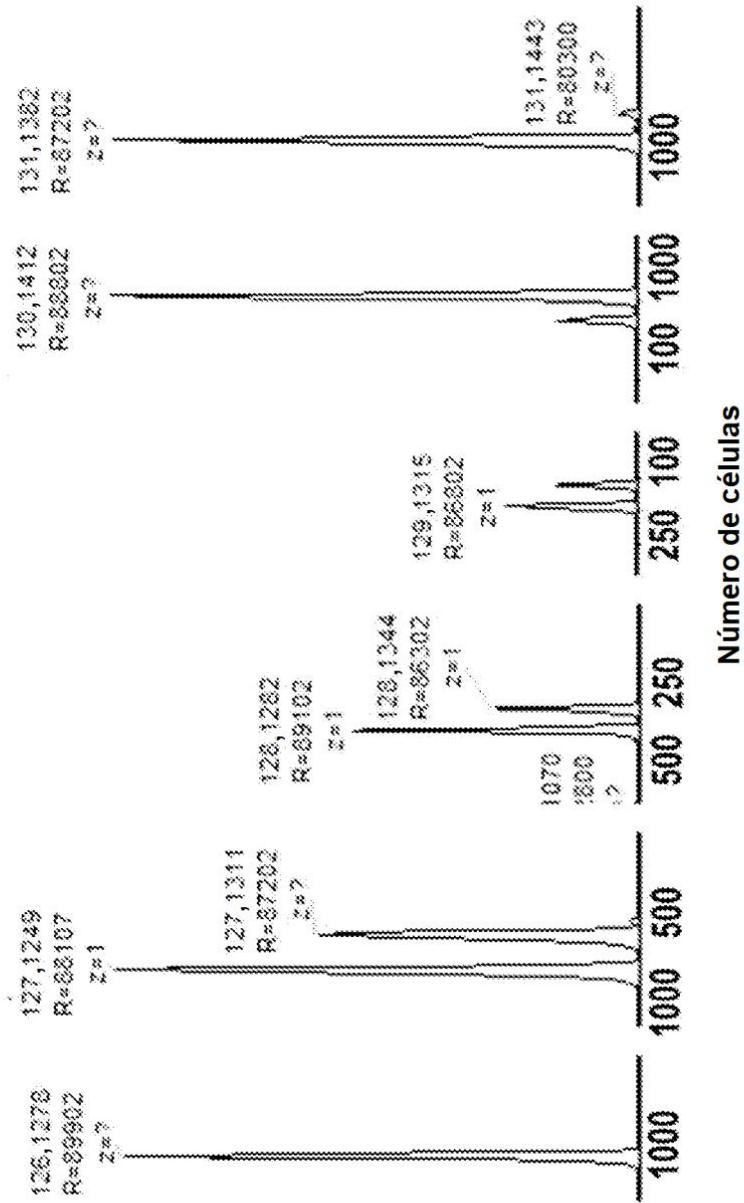


FIG. 5C

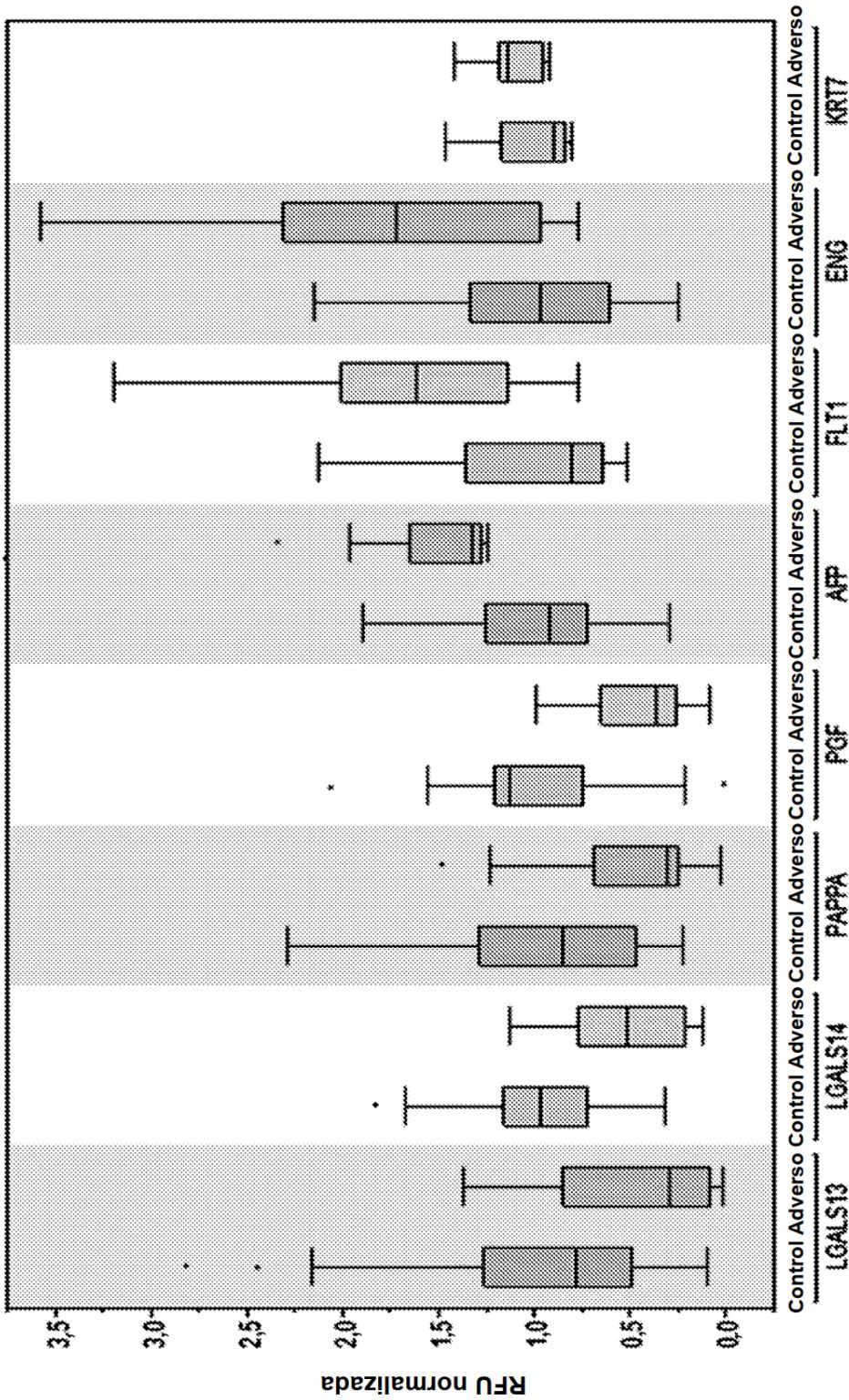


FIG. 6

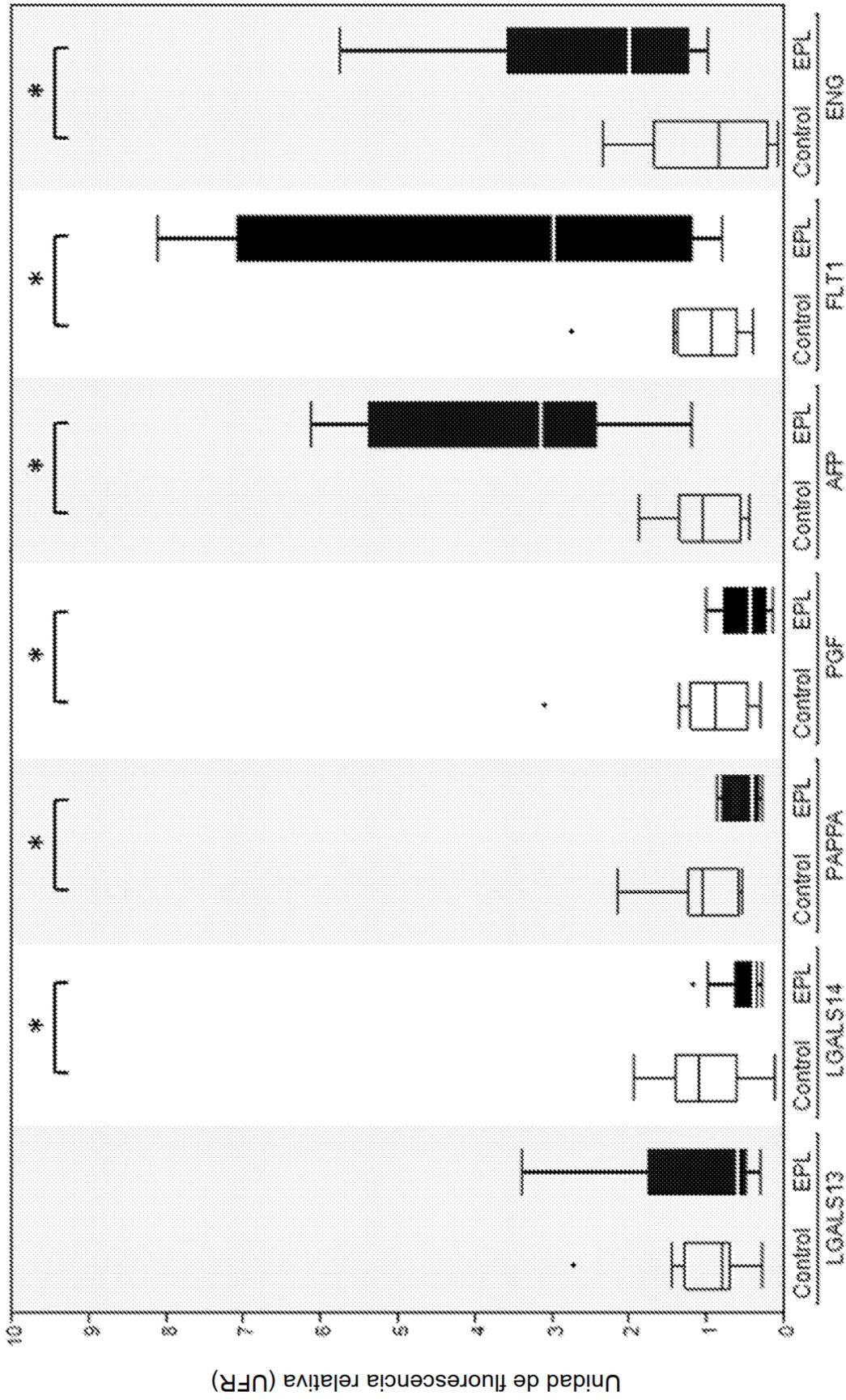


FIG. 7