

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 048**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6834 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2016 PCT/IB2016/052495**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2016 E 16721243 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3289099**

54 Título: **Uso de una membrana capilar porosa para determinar la cantidad de productos de amplificación por círculo rodante**

30 Prioridad:

30.04.2015 GB 201507376

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

22.01.2021

73 Titular/es:

**VANADIS DIAGNOSTICS (100.0%)
Vetenskapsvägen 10
19138 Sollentuna, SE**

72 Inventor/es:

**ÖHMAN, OVE;
PERSSON, FREDRIK y
HOWELL, MATHIAS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 803 048 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

Uso de una membrana capilar porosa para determinar la cantidad de productos de amplificación por círculo rodante

5 Antecedentes

Las pruebas prenatales no invasivas proporcionan información sobre el estado o salud de un feto usando una muestra de sangre materna u otra muestra obtenida de forma no invasiva de la mujer embarazada. La detección temprana del estado o salud del feto permite intervenciones dirigidas y tratamientos médicos.

10 La amplificación por círculo rodante (RCA) es útil para analizar ADN libre de células en sangre materna. Sin embargo, cuantificar los productos de RCA con solidez estadística puede ser desafiante. A nivel práctico, aunque los números absolutos de los productos en una reacción de RCA pueden ser suficientemente altos para proporcionar solidez estadística, la concentración molar de amplicones de RCA específicos en la reacción puede ser bastante baja, lo que limita los tipos de métodos que se pueden usar para cuantificarlos. Por ejemplo, los productos de RCA en una muestra se pueden, en teoría, detectar marcando los productos de RCA, depositando la muestra en la superficie de un portaobjetos de vidrio, y contando el número de productos marcados en el portaobjetos. Sin embargo, simplemente colocar una solución que contiene productos de RCA marcados en un portaobjetos de vidrio, dejar que los productos de RCA marcados difundan en la superficie y después contar el número de productos de RCA marcados que se han unido al portaobjetos lleva varias horas y no todos los productos de RCA marcados alcanzan el portaobjetos y se cuentan.

25 Nilsson et al, Nucleic Acids Research, 2002, Vol. 30, No. 14 e66, se refiere al seguimiento en tiempo real de amplificación por círculo rodante usando un diseño de baliza molecular modificada.

El uso de filtración en un soporte sólido para cuantificar productos de RCA marcados se describe en el presente documento. Como se describirá en mayor detalle posteriormente, los métodos pueden facilitar el análisis de muestras que contienen productos de RCA.

30 Compendio

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

35 Se proporciona un método de análisis de muestras. En ciertas formas de realización, el método puede comprender: (a) filtrar una muestra líquida que contiene productos de amplificación por círculo rodante (RCA) usando una membrana capilar porosa, mediante lo cual se produce una matriz de productos de RCA en la membrana; en donde la muestra contiene al menos una primera población de productos de RCA y una segunda población de productos de RCA, en donde la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados están marcados de forma distinguible; y (b) determinar la cantidad de la primera población marcada de productos de RCA y la cantidad de la segunda población marcada de productos de RCA en un área de la membrana. La etapa de determinación incluye contar el número de primeros y segundos productos de RCA marcados en el área. En algunas formas de realización, la etapa de determinación puede incluir detectar una señal agregada del área. En cualquier caso, el método puede proporcionar una estimación del número de la primera y segunda poblaciones de productos de RCA en la muestra.

45 Dependiendo de cómo se implementa el método, el uso de la membrana capilar porosa puede permitir la cuantificación de sustancialmente todos los productos de RCA en una muestra (no solo los que casualmente difunden a la superficie del portaobjetos de vidrio) y esto, a su vez, aumenta la precisión, sensibilidad y reproducibilidad del ensayo. Además, el uso de la membrana capilar porosa permite que el ensayo se haga en minutos más que en horas en comparación con algunos métodos alternativos que, como se ha indicado anteriormente, pueden depender de pipetear una muestra sobre un portaobjetos de vidrio y después incubar el portaobjetos durante un periodo de tiempo extendido en la esperanza de que los productos de RCA difundan y se peguen a la superficie del portaobjetos. Consistente con esto, la sección experimental de la presente solicitud describe que la práctica del presente método puede producir que se cuenten al menos 2,5 veces más productos de RCA después de 90 segundos (lo que equivale al tiempo que lleva colocar la muestra encima de la membrana y después pasar la muestra a través de la membrana) en comparación con la incubación de 16 horas en un portaobjetos de vidrio. Además, el uso de la membrana puede reducir el fondo al permitir que las fuentes potenciales de fondo (por ejemplo, moléculas fluorescentes de oligonucleótidos que no han hibridado con un producto de RCA, o similares) atraviesen la membrana (en particular si la membrana se lava después de que se hayan aplicado los productos de RCA).

60 El método encuentra uso particular en analizar muestras que tiene un intervalo relativamente amplio de concentraciones de productos de RCA (por ejemplo, de 10 a 10M productos de RCA en un volumen de 50 µl a 200 µl o más) que en muchos casos pueden tener una concentración relativamente baja porque, como se ha mencionado anteriormente, la membrana sirve para concentrar los productos de RCA en la superficie de la membrana. Puesto de otra manera, sin usar la membrana y usar en su lugar un enfoque alternativo, una muestra de 50 µl se extendería sobre la superficie de un portaobjetos de microscopio de vidrio y, incluso si se pudiera inducir que todos los productos de RCA se unieran al portaobjetos, los productos de RCA estarían tan espacialmente separados entre sí en el

5 portaobjetos que un único campo de vista solo contendría un número insuficiente de productos de RCA, lo que hace de esta manera que lleve mucho tiempo y sea ineficaz cuantificarlos por microscopía u otro medio con una exactitud razonable. Dependiendo de cómo se implementa el método, la membrana puede servir para concentrar y soportar los productos de RCA mientras que, al mismo tiempo, proporciona un medio por el que los productos de RCA se pueden lavar con el fin de disminuir el fondo. Además, la membrana puede servir como un portaobjetos para microscopía, en particular si es transparente o se puede hacer transparente por la adición de un agente humectante.

10 En suma, se cree que el presente método proporciona un modo rápido, muy preciso, sensible y reproducible de determinar la cantidad de productos de RCA -un producto que ya se hace él mismo sin sesgo en el sentido de que cada molécula diana está representada por solo un producto de RCA (en contraste con PCR en la que cada molécula diana se amplifica a un número desconocido de copias y las diferentes moléculas diana se amplifican en diferentes cantidades)- en una muestra. Como tal, el presente método debe demostrar que es inestimable para aplicaciones en las que las medidas rápidas, precisas y exactas de la abundancia de moléculas de ADN en una muestra son esenciales. En particular, el presente método debe demostrar que es valioso para pruebas prenatales no invasivas, donde las medidas rápidas, precisas y exactas de la abundancia de moléculas de ADN de concentración relativamente baja que están en fracciones sin células del torrente sanguíneo materno son críticas.

Estas y otras potenciales características y ventajas se pueden volver aparentes en vista de la siguiente descripción.

20 **Breve descripción de las figuras**

El experto en la materia entenderá que los dibujos, descritos a continuación, son para fines ilustrativos solo. No se pretende que los dibujos limiten el ámbito de las presentes enseñanzas en modo alguno.

25 La figura 1 ilustra esquemáticamente algunas de las etapas del presente método.

La figura 2 ilustra esquemáticamente algunos de los principios del presente método.

30 La figura 3 es un gráfico que representa el número de cuentas por imagen en el eje y, y las muestras, tiempos de incubación, y tipo de placa de vidrio u óxido de aluminio en el eje x.

La figura 4 es un histograma que muestra algunos de los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 2.

35 La figura 5 es un gráfico de las proporciones entre las cuentas para dos canales relativo a composición mixta de líneas celulares.

Descripción detallada

40 Antes de que se describan las varias formas de realización, se debe entender que las enseñanzas de esta divulgación no están limitadas a las formas de realización particulares descritas, y como tal pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir formas de realización particulares solo, y no se pretende que sea limitante, ya que el ámbito de las presentes enseñanzas estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

45 Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son para fines de organización solo y no se deben interpretar como limitantes del objeto descrito en modo alguno. Mientras que las presentes enseñanzas se describen junto con varias formas de realización, no se pretende que las presentes enseñanzas estén limitadas a tales formas de realización. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan varias alternativas, modificaciones, y equivalentes, como apreciarán los expertos en la materia.

50 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. Aunque también se pueden usar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de las presentes enseñanzas, algunos métodos y materiales ejemplares se describen ahora.

60 La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no se debe interpretar como una admisión de que las presentes reivindicaciones no están autorizadas a preceder tales publicaciones en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales lo que puede necesitar confirmarse de forma independiente.

65 Como será aparente para los expertos en la materia tras leer esta divulgación, cada una de las formas de realización individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene componentes y características discretos que se pueden fácilmente separar de o combinar con las características de cualquiera de las otras varias formas de realización sin separarse del ámbito o espíritu de las presentes enseñanzas. Cualquier método enumerado se puede llevar a cabo en el orden de sucesos enumerados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Antes de describir formas de realización ejemplares en mayor detalle, se explican los siguientes significados para ilustrar el significado y ámbito de los términos usados en la descripción.

5 Se debe advertir que como se usan en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Por ejemplo, el término “un cebador” se refiere a uno o más cebadores, es decir, un único cebador y múltiples cebadores. Se indica además que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta afirmación se pretende que sirva como base antecedente para uso de tal terminología exclusiva como “solamente”,
10 “solo” y similares en relación con la enumeración de elementos de las reivindicaciones, o el uso de una limitación “negativa”.

Como se usa en el presente documento, el término “filtrar” incluye el acto de mover un líquido que contiene analitos (por ejemplo, productos de amplificación por círculo rodante) a través de un filtro de modo que algunos de los analitos son retenidos por el filtro. Al filtrar, al menos algo del líquido se transfiere desde un lado del filtro al otro.

Como se usa en el presente documento, el término “amplificación por círculo rodante” o “RCA” incluye una amplificación isotérmica que genera copias concatemerizadas lineales de un molde de ácido nucleico circular usando una polimerasa de desplazamiento de la hebra. RCA es bien conocida en las artes de biología molecular y se describe en una variedad de publicaciones incluyendo, pero no limitadas a Lizardi et al (Nat. Genet. 1998 19:225-232), Schweitzer et al (Proc. Natl. Acad. Sci. 2000 97:10113-10119), Wiltshire et al (Clin. Chem. 2000 46:1990-1993) y Schweitzer et al (Curr. Opin. Biotech 2001 12:21-27).

Como se usa en el presente documento, el término “productos de amplificación por círculo rodante” incluye los productos concatemerizados de una reacción de amplificación por círculo rodante. Como se usa en el presente documento, el término “productos de amplificación por círculo rodante marcados con fluorescencia” se refiere a productos de amplificación por círculo rodante que se han marcado fluorescentemente, por ejemplo, hibridando un oligonucleótido fluorescentemente marcado a los productos de amplificación por círculo rodante u otros medios (por ejemplo, por incorporación de un nucleótido fluorescente en el producto durante la amplificación).

Como se usa en el presente documento, el término “membrana capilar porosa” incluye membranas que tienen capilares individuales relativamente densamente empaquetados que abarcan el espesor de la membrana, es decir, que van de un lado de la membrana al otro, permitiendo de esta manera el paso de líquido, pero no partículas, de un lado de la membrana al otro. Los ejemplos de membranas capilares porosas incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, membranas de óxido de aluminio anódico (véase posteriormente), membranas de vidrio de nanocanal, membranas grabadas con rutas y politetrafluoroetileno. Las membranas de vidrio de nanocanal están hechas de vidrio y tienen una alta densidad de canales uniformes con diámetros de 15 micrómetros a 15 nanómetros (véase, por ejemplo, Tonucci et al., Advances in Nanophotonics II, AIP Conference Proceedings, 2007 959: 59-71; Pearson et al, Science 1995 270: 68-70 y Tonucci et al., Science 1992 258: 783-785, así como las patentes en EE UU 5.306.661; 5.332.681; 5.976.444; 6.087.274; 6.376.096; 6.483.640; y 6.599.616).

Las membranas grabadas con rutas están hechas de polímero transparente (por ejemplo, policarbonato, tereftalato de polietileno o poliimida y similares) que contienen poros que tienen un diámetro en el intervalo de 0,01 μm a 30 μm que se han hecho por una combinación de bombardeo de partículas cargadas (o irradiación) y grabado químico. Otras membranas porosas de interés incluyen, pero no están limitadas a fluoropolímeros amorfos tal como NAFION™, TEFLON AF™, FEFLON FEIP™, y CYTOP™ (DuPont Fluoroproducts, Fayetteville, NC). Como se reconocerá, una membrana capilar porosa puede tener una superficie (por ejemplo, un recubrimiento o una superficie químicamente modificada) que es diferente del material del que está hecha la membrana. Por ejemplo, la superficie de una membrana capilar porosa puede tener una característica de carga alterada o hidrofobicidad o características hidrofílicas alteradas.
50 En algunas formas de realización, la superficie puede estar recubierta con aminosilano, polisilina u otro compuesto para proporcionar una carga positiva que ayuda a retener los productos de RCA en la superficie. Alternativamente o además, la superficie puede tener una capa fina de un metal (por ejemplo, titanio, oro) depositado en la misma, que puede estar unido a otros agentes que modifican las propiedades de superficie del filtro.

Como se usa en el presente documento, el término “membrana de óxido de aluminio anódico” incluye una estructura membranosa nanoporosa autoorganizada regular que se produce cuando se anodiza Al en ciertos medios ácidos. El diámetro interior de los poros en la membrana, la distancia entre los centros de poros adyacentes en la membrana, y la distancias entre los bordes de poros adyacentes en la membrana se pueden controlar por el voltaje de la deposición, el tipo de ácido, y otros parámetros. Una membrana de óxido de aluminio anódico es virtualmente transparente cuando está húmeda. La membrana de óxido de aluminio anódico, sus propiedades, y cómo hacer tales membranas se revisan en detalle en una variedad de publicaciones incluyendo, pero no limitadas a: Li et al (Chem. Mater 1998 10: 2470-2480), Santos et al (Trends on Analytical Chemistry 2013 44: 25-38), Ingham et al (Biotechnology Advances 30 2012 1089-1099) y Poinern et al. (Materials 2011 4: 487-526). Las membranas de óxido de aluminio anódico están comercialmente disponibles bajo el nombre comercial ANOPORE™ de, por ejemplo, SPI Supplies (West Chester, PA) y de otros vendedores tal como Sykera Technologies Inc (Longmont, CO) y Sigma-Aldrich (San Luis, MO) y se pueden comprar con un anillo soporte.

Como se usa en el presente documento, el término “área”, en el contexto de un área de una membrana o un área de una imagen incluye un área contigua o no contigua. Por ejemplo, si un método implica determinar la cantidad de productos de RCA marcados en un área, por ejemplo, contar el número de productos de RCA marcados en un área, el área en que los productos de RCA se cuantifican puede ser un espacio único, contiguo o espacios múltiples no contiguos.

Como se usa en el presente documento, el término “imagenología” incluye un proceso por el cual señales ópticas de la superficie de un objeto se detectan y almacenan como datos en asociación con una localización (es decir, un “pixel”). Se puede reconstruir una imagen digital del objeto a partir de estos datos. Se puede hacer imagenología de un área de membrana usando una única imagen o una o más imágenes.

Como se usa en el presente documento, el término “productos de RCA marcados individuales” incluye moléculas de RCA individuales que están marcadas.

Como se usa en el presente documento, el término “determinar la cantidad” incluye métodos en los que productos de RCA individualmente resueltos se cuentan, así como métodos que incluyen medir una señal agregada de múltiples productos de RCA. En métodos que implican medir la intensidad de una señal agregada, no se necesita resolver los productos de RCA individuales. La cantidad de productos de RCA se puede expresar usando cualquier unidad adecuada. En algunos casos, la cantidad de productos de RCA se puede expresar como el número de productos de RCA individualmente resueltos que se han contado.

Como se usa en el presente documento, el término “contar” incluye determinar el número de objetos individuales en una colección mayor. En formas de realización, “contar” requiere detectar señales separadas de objetos individuales en una pluralidad (no una señal colectiva de la pluralidad de objetos) y después determinar cuantos objetos hay en la pluralidad contando las señales individuales. En el contexto de los métodos presentes, “contar” se puede realizar determinando el número de señales individuales en una matriz de señales.

Como se usa en el presente documento, el término “transparente” incluye un estado en el que un objeto es ópticamente transparente a la longitud de onda que se usa. Para microscopia de fluorescencia, “transparente” significa que el objeto será transparente a uno o ambos de los espectros de excitación y emisión de un fluoróforo. Como se describirá en mayor detalle posteriormente, ciertas membranas son transparentes solo cuando se han humedecido. Tales membranas se consideran membranas transparentes incluso aunque la forma seca de esas membranas pueda no ser transparente.

Como se usa en el presente documento, el término “matriz” con referencia a una matriz de productos de RCA incluye una colección de productos de RCA únicos en una superficie planar, donde los productos de RCA están espacialmente separados entre sí en el plano de la superficie (al nivel permitido por la distribución de Poisson de la matriz es verdaderamente aleatorio). Una matriz “aleatoria” incluye una matriz en donde los elementos, por ejemplo, productos de RCA, están distribuidos en la superficie de un sustrato en posiciones que no están predeterminadas. En algunos casos, la distribución de los productos de RCA en una matriz aleatoria se puede describir por la estadística de Poisson, de modo que, por ejemplo, la distribución de distancias entre los productos de RCA de una matriz aleatoria se puede aproximar usando una distribución de Poisson. En otras palabras, los productos de RCA se pueden distribuir aleatoriamente, es decir, en localizaciones no predeterminadas, en una membrana.

Otros significados de estos y otros términos pueden aparecer a lo largo de la especificación.

Antes de describir el presente método en más detalle, se reconoce que el presente método se puede implementar usando cualquier tipo de soporte de captura que pueda actuar como un filtro para productos de RCA. Tales soportes de captura deben tener una señal de fondo baja a las longitudes de onda usadas en el análisis y un tamaño de poro suficiente para permitir el flujo continuo rápido de líquido y la captura de productos de RCA. Los soportes de captura adecuados pueden estar hechos de materiales porosos orgánicos o inorgánicos incluyendo sólidos tal como metales porosos, cerámicos, películas homogéneas (por ejemplo, polímeros) y sólidos heterogéneos (mezclas poliméricas, vidrios mezclados). Las membranas cerámicas porosas se puede hacer de materiales inorgánicos (tal como alúmina, titania, óxidos de zirconia, carburo de silicio recristalizado). Véase, por ejemplo, el PamChip vendido por Pamgene (Países Bajos), Wu et al, *Nucleic Acids Res.* 2004 32: e123 y Anthony et al *Biotechniques.* (2003) 34:1082-6, 1088-9. Las membranas de polímero porosas pueden estar hechas de acetato de celulosa, ésteres de celulosa (CA, CN y CE), polisulfona (PS), poliéter sulfona (PES), poliacrilonitrilo (PAN), poliamida, poliimida, polietileno y polipropileno (PE y PP), politetrafluoroetileno (PTFE), fluoruro de polivinilideno (PVDF) y cloruro de polivinilo (PVC). Como tal, en algunas formas de realización, el método puede comprender: (a) filtrar una muestra líquida que contiene productos de amplificación por círculo rodante (RCA) usando un soporte de captura que actúa como un filtro para los productos de RCA, produciendo mediante ello una matriz de los productos de RCA en el soporte; en donde la muestra contiene al menos una primera población de productos de RCA y una segunda población de productos de RCA, en donde la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados están marcados de forma distinguible; y (b) determinar la cantidad de la primera población marcada de productos de RCA y la cantidad de la segunda población marcada de productos de RCA en un área de la membrana.

La descripción que sigue a continuación ilustra una implementación en la que se usa una membrana capilar porosa. Las membranas capilares porosas son un ejemplo de un soporte de captura que se podría usar. La siguiente descripción ilustra el presente método mediante ejemplo.

5 Como se resume anteriormente, se proporciona un método de análisis de muestra. En ciertas formas de realización, el método puede comprender: (a) filtrar una muestra líquida que contiene productos de amplificación por círculo rodante (RCA) a través de una membrana capilar porosa, produciendo mediante ello una matriz de productos de RCA en la membrana; (b) marcar fluorescentemente los productos de RCA antes o después de la etapa (a); y (c) determinar la cantidad de los productos de RCA marcados individuales en un área de la membrana, proporcionando mediante 10 ello una estimación del número de los productos de RCA marcados en la muestra. El método se puede realizar en una variedad de diferentes maneras, una implementación del cual se ilustra esquemáticamente en la figura 1. Con referencia a la figura 1, ciertas formas de realización del método implican: filtrar una muestra líquida **2** que contiene productos de amplificación por círculo rodante (RCA) marcados fluorescentemente **4** a través de una membrana capilar porosa **6** (por ejemplo, una membrana de óxido de aluminio anódico). La etapa de filtración concentra las partículas y produce una matriz de los productos de RCA **8** en la membrana **6**. En la forma de realización ilustrada, la siguiente etapa implica detectar las partículas mientras están en la membrana. En algunas formas de realización, esta etapa puede producir una imagen **10** de la matriz **8**. Como sería aparente, la detección la puede hacer cualquier detector de fluorescencia adecuado, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia, un escáner, usando un detector CMOS o CCD de alta resolución o usando un PMT o similar. Por último, se determina la cantidad de productos de RCA marcados en el área de la membrana, por ejemplo, contando productos de RCA individualmente resueltos, o midiendo una señal agregada, etc. Esta determinación proporciona una estimación del número de productos de RCA marcados **12** en la muestra **2**. En ciertas formas de realización y dependiendo de cómo se realiza el método, el filtro se puede humedecer, por ejemplo, con un agente humectante (por ejemplo, un aceite de inmersión o glicerol) para humedecer la membrana y hacerla transparente). En estas formas de realización, la membrana capilar porosa se puede hacer transparente usando un agente humectante después de que los productos de RCA se filtren y antes de que las cantidades de los productos de RCA se determinen. En algunas formas de realización, los productos de RCA se pueden marcar después de la etapa de filtración. Además, en algunos casos no se necesita producir y almacenar una imagen de la matriz. En estas formas de realización, el análisis de la matriz se puede hacer durante o inmediatamente después de la imagenología. En algunas formas de realización en las que el análisis incluye contar, el detector de fluorescencia usado debe ser suficiente para resolver los diferentes productos de RCA en la membrana. En algunas formas de realización, el detector de fluorescencia puede tener una resolución de menos de 10 μm , por ejemplo, menos de 5 μm o menos de 1 μm . En formas de realización que implican medir una señal agregada, el detector de fluorescencia no necesita tener tal resolución.

35 En cualquier forma de realización, los poros de la membrana capilar deben ser de suficiente tamaño para prevenir que los productos de RCA pasen a través de los poros. Por ejemplo, en formas de realización, el diámetro de poro de la membrana capilar puede ser no más del 50% de diámetro mediana de los productos de RCA, mientras que en algunas formas de realización puede ser no más del 20% del diámetro mediana de los productos de RCA, y en algunas formas de realización no más del 10% del diámetro mediana de los productos de RCA. Como tal, al filtrar la muestra usando la membrana capilar porosa, los productos de RCA deben permanecer encima de la membrana y no deben entrar del todo o pasar a través de los poros.

45 En ciertas formas de realización, la membrana capilar porosa no comprende un agente de captura anclado (por ejemplo, un oligonucleótido, un anticuerpo o estreptavidina o similar anclado) que específicamente hibride con o se una a los productos de RCA. En estas formas de realización, los productos de RCA no se unen a la membrana capilar porosa a través una interacción específica (por ejemplo, una específica de secuencia). En tales formas de realización, la membrana capilar porosa no comprende una pluralidad de diferentes agentes de captura específicos de secuencias anclados (por ejemplo, oligonucleótidos) que están anclados a la membrana en localizaciones espacialmente direccionables en forma de una micromatriz, como se describe en el documento US2006022813.

50 En ciertas formas de realización, no se necesita que tengan lugar reacciones bioquímicas (por ejemplo, una reacción que produzca la rotura o formación de un enlace covalente) diferentes que la producción de una señal luminosa en la membrana, después de los productos de RCA se filtren a través de la membrana.

55 Como sería aparente, los productos de amplificación por círculo rodante (RCA) no se desnaturalizan antes de filtrarlos a través de la membrana (por ejemplo, no se exponen a una temperatura de al menos 90°C durante al menos 2 minutos).

60 La figura 2 muestra algunos de los principios del método de una forma de realización ejemplar. En la primera etapa, una muestra que contiene productos de RCA marcados con fluorescencia se coloca en un recipiente, por ejemplo, un pocillo que contiene la membrana, por ejemplo, como la superficie inferior. La muestra se concentra aplicando presión que extrae la fase líquida de la muestra a través de la membrana. Los productos de RCA se retienen en la superficie de la membrana en forma de una matriz a una densidad de, por ejemplo, al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 500, al menos 1.000, al menos 5.000, o al menos 10.000/mm². Si la membrana no es ya transparente, entonces, después de la adición de un agente humectante la membrana se vuelve transparente y los productos de RCA se

pueden detectar, por ejemplo, hacer imágenes. Los productos de RCA también se pueden fijar en su sitio usando un fijador, de modo que la membrana se pueda transportar y/o almacenar de modo que se puedan volver a leer si se obtiene un resultado positivo. En algunas formas de realización, el agente humectante, además de hacer la membrana transparente, también actúa como un fijador. La matriz se puede analizar desde cualquier lado de la membrana, por ejemplo, a través de la membrana (como se muestra en la figura 2). Como sería aparente, si la membrana se lee desde “arriba”, es decir, desde el mismo lado que los productos de RCA, la membrana no necesita ser transparente. En algunas formas de realización, la membrana se puede secar antes del transporte y análisis. El área analizada puede contener al menos 10, por ejemplo, al menos 100, al menos 1.000, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 50.000, al menos 100.000, o al menos 200.000 o más productos de RCA.

Si se desea, los productos de RCA se pueden marcar mientras están unidos a la membrana y, en ciertas formas de realización, la membrana se puede lavar, por ejemplo, con agua o un tampón acuoso que contenga sal, después de que la matriz de productos de RCA marcados se haya producido y antes del análisis. Esta etapa de lavado puede reducir el fondo porque se pueden lavar fuentes potenciales de fondo (por ejemplo, nucleótidos marcados u oligonucleótidos marcados que no están hibridados a un producto de RCA) a través del filtro y no se asocian con el filtro en el momento en que el filtro se analiza. Si es necesario, otros reactivos, por ejemplo, un agente anti-desvanecimiento o reactivos que aumentan la fluorescencia o similares, se pueden añadir a la membrana antes del análisis con el fin de disminuir el fondo o aumentar la señal o similares. Asimismo, si es necesario, los productos de RCA marcados se pueden unir (de forma covalente o no covalente) a la superficie de la membrana antes del análisis si es necesario. Las químicas para unir biomoléculas a una superficie se conocen bien y, en ciertos casos, los productos de RCA se pueden hacer usando un nucleótido modificado en un cebador que tiene un grupo que es específicamente reactivo con la superficie de la membrana, asegurando de esta manera que solo los productos de RCA se unen a la superficie.

En ciertas formas de realización, la etapa de filtrado se hace al (i) colocar la muestra en la membrana porosa; y (ii) aplicar una fuerza que mueve la muestra a través de la membrana. La fuerza aplicada a la muestra puede ser una fuerza activa (por ejemplo, una fuerza centrífuga, una presión negativa o una presión positiva) o una fuerza pasiva (por ejemplo, a través de acción capilar (usando papel de transferencia, por ejemplo) o evaporación).

Como se ha indicado anteriormente, el diámetro interior de los poros en la membrana, la distancia entre los centros de poros adyacentes en la membrana, y la distancia entre los bordes de poros adyacentes en la membrana se pueden controlar por el voltaje de la deposición, el tipo de ácido, y otros parámetros (véase, en general, Poinern, anteriormente). En algunas formas de realización, el diámetro interior de los poros en la membrana puede estar en el intervalo de 5 nm a 500 nm, por ejemplo, de 4 nm a 250 nm, de 4 nm a 50 nm, de 50 nm a 100 nm, de 100 nm a 200 nm o de 200 nm a 500 nm. Independientemente, la distancia media entre los centros de poros adyacentes en la membrana puede estar en el intervalo de 50 nm a 1000 nm, por ejemplo, de 50 nm a 420 nm, de 50 nm a 100 nm, de 100 nm a 250 nm, de 250 nm a 500 nm o de 500 nm a 1000 nm. La distancia media entre los bordes de poros adyacentes en la membrana puede estar en el intervalo de 10 nm a 500 nm, de 10 nm a 50 nm, de 50 nm a 200 nm, o de 200 nm a 500 nm. Se puede entender que los valores del diámetro y la distancia media entre poros proporcionados en el presente documento son ejemplares, y tales valores pueden variar basados en la forma de realización.

En algunas formas de realización, el diámetro de poro y la distancia entre los centros de poros adyacentes se puede optimizar para proporcionar productos de RCA marcados que sean resolubles individualmente mediante el sistema de detección usado. Específicamente, en ciertos casos, los poros en la membrana pueden tener un diámetro relativamente grande (por ejemplo, un diámetro en el intervalo de 100 nm a 500 nm) y la distancia media entre los centros de poros adyacentes en la membrana puede ser relativamente grande (por ejemplo, en el intervalo de 200 nm a 1000 nm, por ejemplo, de 200 nm a 420 nm), de modo que cada uno de los productos de RCA marcados es atraído a la entrada de un poro (“bloqueando” de forma eficaz el poro) y la distancia entre productos de RCA marcados adyacentes se puede resolver por microscopía de fluorescencia. Estas distancias óptimas se pueden disminuir si se usa microscopía de fluorescencia de super resolución (Huang et al, Annu. Rev. Biochem. 2009 78: 993-1016).

La membrana usada puede ser de cualquier espesor adecuado, por ejemplo, en el intervalo de 20 μm a 500 μm o de 50 μm a 200 μm , según se desee y, como se ha indicado anteriormente, puede contener una o más estructuras de soporte (por ejemplo, un anillo de soporte) con el fin de mantener la integridad de la membrana durante el uso.

Como se ha indicado anteriormente, el presente método se puede usar en protocolos que requieran cuantificación precisa del número de productos de RCA en una muestra, en particular una muestra que tiene una concentración variable de productos de RCA (por ejemplo, de 10 a 10M que pueden estar a una concentración relativamente baja, por ejemplo, de 5.000 a 1M productos de RCA en un volumen de 50 μl a 200 μl o más) y la resolución estadística requerida para identificar una diferencia solo se puede alcanzar solo contando al menos 1.000, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 50.000, al menos 100.000 o al menos 200.000 o más productos de RCA. Como se describirá en mayor detalle posteriormente, el método tiene uso particular en análisis de número de copia y en aplicaciones de ensayos prenatales no invasivos.

En algunas formas de realización, la muestra puede contener múltiples poblaciones de productos de RCA (por ejemplo, dos, tres, o cuatro o más poblaciones de productos de RCA, tal como una primera población de productos de RCA y

una segunda población de productos de RCA), donde las diferentes poblaciones de productos de RCA están distinguiblemente marcadas, lo que significa que los miembros individuales de cada una de las poblaciones de marcadores de productos de RCA se pueden detectar independientemente y contar, incluso cuando las poblaciones están mezcladas. Los pares de marcadores fluorescentes distinguibles adecuados útiles en los métodos objeto incluyen Cy-3 y Cy-5 (Amersham Inc., Piscataway, NJ), Quasar 570 y Quasar 670 (Biosearch Technology, Novato CA), Alexafluor555 y Alexafluor647 (Molecular Probes, Eugene, OR), BODIPY V-1002 y BODIPY V1005 (Molecular Probes, Eugene, OR), POPO-3 y TOTO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR), y POPRO3 TOPRO3 (Molecular Probes, Eugene, OR). Se pueden encontrar marcadores detectables distinguibles adecuados adicionales en Kricka et al. (Ann Clin Biochem. 39:114-29, 2002). Por ejemplo, los productos de RCA se pueden marcar con cualquier combinación de ATTO, ALEXA, CY, o colorantes diméricos de cianina tal como YOYO, TOTO etc. También se pueden incluir marcadores adicionales. Los métodos ejemplares para hacer poblaciones distinguibles de productos de RCA marcados se describen en, por ejemplo, el documento PCT/US2014/06771, presentado el 26 de noviembre, 2014 y el documento PCT/US2014/067719, presentado el 26 de noviembre, 2014. En algunos casos, una población de productos de RCA se puede marcar distinguiblemente marcándola con marcadores múltiples, aumentando de esta manera las posibilidades de multiplexación. Por ejemplo, en algunos casos, los productos de RCA de una población se pueden marcar cada uno con dos colorantes distinguibles (por ejemplo, tanto Cy3 como Cy5). Cuando se lee, tales productos de RCA marcados dualmente serán distinguibles de productos de RCA que están marcados con un colorante individual (por ejemplo, Cy3 o Cy5).

En algunas formas de realización, una primera población de productos de RCA puede representar una población de "prueba" de productos de RCA marcados y una segunda población de productos de RCA puede representar una población de "referencia" de productos de RCA a la que se puede comparar el número de los primeros productos de RCA. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la primera población de productos de RCA puede corresponder a una primera región cromosómica (por ejemplo, un primer cromosoma tal como el cromosoma 21) y la segunda población de productos de RCA puede corresponder a una segunda región cromosómica (por ejemplo, un segundo cromosoma tal como el cromosoma 13 o 18 o una región diferente del primer cromosoma) y el número de la primera población de productos de RCA y la segunda población de productos de RCA se pueden contar y comparar para determinar si hay una diferencia en el número de copia de las regiones (que indica que hay duplicación o delección de la región de prueba). En algunas formas de realización, la muestra contiene al menos una primera población de productos de RCA y una segunda población de productos de RCA, en donde la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados se marcan distinguiblemente en la etapa de marcaje. En estas formas de realización, los métodos comprenden determinar la cantidad de (por ejemplo, contar el número de) los primeros productos de RCA marcados en un área de la membrana y determinar la cantidad de (por ejemplo, contar el número de) los segundos productos de RCA marcados en un área (la misma área o un área diferente) de la membrana, proporcionando de esta manera una estimación de la cantidad de la primera y segunda poblaciones de productos de RCA en la muestra. Esta forma de realización puede implicar además comparar el número de los primeros productos de RCA en la muestra con el número de segundos productos de RCA en la muestra.

En algunas de estas formas de realización de los métodos, los métodos pueden comprender imagenología de la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados para producir una o más imágenes (por ejemplo, una imagen o una primera imagen y una segunda imagen, respectivamente) y, opcionalmente, (i) determinar la cantidad de productos de RCA marcados en la una o más imágenes, proporcionando de esta manera una estimación de la cantidad de la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados en la muestra. La primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados se pueden detectar por separado usando métodos conocidos (por ejemplo, usando filtros apropiados, etc.). La detección de productos de RCA se puede hacer secuencialmente (en formas de realización en las que, por ejemplo, se pueden producir imágenes separadas para cada marcador y los productos de RCA de cada población se pueden analizar secuencialmente. La detección de productos de RCA también se puede hacer sustancialmente de forma simultánea (formas de realización en las que, por ejemplo, se puede producir una imagen única que muestra ambas poblaciones de productos de RCA y los productos de RCA de cada población se pueden analizar sustancialmente al mismo tiempo, es decir, sustancialmente de forma simultánea. Estas formas de realización de los métodos pueden comprender además comparar la cantidad de los primeros productos de RCA marcados en la muestra con la cantidad de los segundos productos de RCA marcados en la muestra. Esta etapa de los métodos puede implicar contar al menos 1.000 (por ejemplo, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 50.000, al menos 100.000, al menos 500.000 hasta 1M o más) productos de RCA marcados en la primera población y contar al menos 1.000 (por ejemplo, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 50.000, al menos 100.000, al menos 500.000 hasta 1M o más) productos de RCA marcados en un área de la membrana, asegurando de esta manera que se puede asignar una diferencia en el número de copia con rigor estadístico.

En formas de realización, los métodos pueden comprender además detectar una diferencia entre la cantidad de los primeros productos de RCA en la muestra respecto a la cantidad de los segundos productos de RCA en la muestra, donde la diferencia tiene un valor P de al menos 0,95, al menos 0,98 o al menos 0,99. En algunas formas de realización, el método se puede usar para detectar al menos una diferencia del 1%, al menos una diferencia del 2%, al menos una diferencia del 3%, o al menos una diferencia del 5%, con un valor P de más de 0,95, 0,98 o 0,99. Por ejemplo, en formas de realización que implican una muestra materna de una mujer embarazada, la fracción fetal de la muestra se puede incluir en este cálculo.

ES 2 803 048 T3

5 Como se ha indicado anteriormente, en algunos casos la muestra que se analiza usando este método puede ser una muestra de ADN sin células obtenida de sangre, por ejemplo, de la sangre de una mujer embarazada. En estas formas de realización, el método se puede usar para detectar anomalías cromosómicas en el feto en desarrollo (como se ha descrito anteriormente) o para calcular la fracción de ADN fetal en la muestra, por ejemplo. Las anomalías de número de copia que se pueden detectar usando el método incluyen, pero no están limitadas a, trisomía 21, trisomía 13, trisomía 18, trisomía 16, XXY, XYY, XXX, monosomía X, monosomía 21, monosomía 22, monosomía 16 y monosomía 15. Se enumeran anomalías de número de copia adicionales que se pueden detectar usando el método presente en la siguiente tabla.

Cromosoma	Anomalía	Asociación con enfermedad
X	XO	Síndrome de Turner
Y	XXY	Síndrome de Klinefelter
Y	XYY	Síndrome doble Y
Y	XXX	Síndrome de trisomía X
Y	XXXX	Síndrome de cuatro X
Y	deleción Xp21	Síndrome de Duchenne/Becker, hipoplasia suprarrenal congénita, enfermedad granulomatosa crónica
Y	deleción Xp22	deficiencia en esteroide sulfatasa
Y	deleción Xp26	enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X
1	1p (somática)	neuroblastoma
	monosomía	
	trisomía	
2	monosomía	retraso de crecimiento, retraso de desarrollo y mental, y anomalías físicas
	trisomía 2q	menores
3	monosomía	linfoma no de Hodgkin
	trisomía (somática)	
4	monosomía	Leucemia linfocítica no aguda (LLNA)
	trisomía (somática)	
5	5p	maullido de gato; síndrome de Lejeune
5	5q	síndrome mielodisplásico
	(somática)	
	monosomía	
	trisomía	
6	monosomía	sarcoma de células claras
	trisomía (somática)	
7	deleción 7q11.23	Síndrome de Williams
7	monosomía	síndrome de monosomía 7 de infancia; somático; adenomas corticales
	trisomía	renales; síndrome mielodisplásico
8	deleción 8q24.1	síndrome de Langer-Giedon
8	monosomía	síndrome mielodisplásico; síndrome de Warkany;
	trisomía	somática: leucemia mielógena crónica
9	monosomía 9p	síndrome de Alfi
9	monosomía 9p	síndrome de Rethore
	trisomía parcial	
9	trisomía	síndrome de trisomía 9 completa, síndrome de trisomía 9 mosaico
10	monosomía	LLA o LLNA
	trisomía (somática)	
11	11p-	Aniridia; tumor de Wilms
11	11q-	síndrome de Jacobsen
11	monosomía	linajes mieloides afectados (LLNA, SMD)
	(somática) trisomía	
12	monosomía	LLC, tumor de células granulosas juvenil (TCGJ)
	trisomía (somática)	
13	13q-	síndrome 13q-; síndrome de Orbeli
13	deleción 13q14	retinoblastoma
13	monosomía	síndrome de Patau
	trisomía	
14	monosomía	trastornos mieloides (SMD, LLNA, LMC atípica)
	trisomía (somática)	
15	deleción 15q11-q13	Prader-Willi, síndrome de Angelman
	monosomía	
15	trisomía (somática)	linajes mieloides y linfoides afectados, por ejemplo, SMD, LLNA, LLA, LLC)
16	deleción 16q13.3	Rubinstein-Taybi
3	monosomía	carcinomas de células renales papilares (malignos)
	trisomía (somática)	

17	17p- (somática)	síndrome 17p en neoplasias malignas mieloides
17	delección 17q11.2	Smith-Magenis
17	17q13.3	Miller-Dicker
17	monosomía	adenomas corticales renales
	trisomía (somática)	
17	17p11.2-12	síndrome de Charcot-Marie Tooth de tipo I; HNPP
	trisomía	
18	18p-	síndrome de monosomía parcial 18p o síndrome de Grouchy Lamy Thieff
18	18q-	síndrome de Grouchy Lamy Salmon Landry
18	monosomía	síndrome de Edwards
	trisomía	
19	monosomía	
	trisomía	
20	20p-	síndrome de trisomía 20p
20	delección 20p11.2-12	Alagille
20	20q-	somática: SMD, LLNA, policitemia vera, leucemia neutrofilica crónica
20	monosomía	carcinomas de células renales papilares (malignos)
	trisomía (somática)	
21	monosomía	síndrome de Down
	trisomía	
22	delección 22q11.2	síndrome de DiGeorge, síndrome velocardiofacial, síndrome de cara anómalamente conotruncada, síndrome de Opitz G/BBB dominante autosómico, síndrome cardiofacial de Caylor
22	monosomía	síndrome de trisomía 22 completa
	trisomía	

Los métodos ejemplares para producir productos de RCA y marcar los mismos se describen en, por ejemplo, el documento PCT/US2014/06771, presentado el 26 de noviembre, 2014 y el documento PCT/US2014/067719, presentado el 26 de noviembre, 2014.

5

Composición

También se divulga una composición. En algunas formas de realización la composición puede comprender: a) una membrana capilar porosa, por ejemplo, una membrana de óxido de aluminio anódico; y b) una matriz de productos de RCA marcados con fluorescencia en una superficie de la membrana. La matriz puede comprender al menos 1.000 productos de RCA marcados (por ejemplo, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 50.000, al menos 100.000, al menos 500.000 o al menos 1M productos de RCA marcados) y los productos de RCA marcados se pueden distribuir a través de la superficie de la membrana de una manera aleatoria a una densidad de, por ejemplo, al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 500, al menos 1.000, al menos 5.000 o al menos 10.000/mm². Como se ha descrito anteriormente, la composición puede comprender una membrana capilar porosa; y al menos dos poblaciones de productos de RCA marcados con fluorescencia en la superficie de la membrana, donde las diferentes poblaciones de productos de RCA marcados con fluorescencia están marcadas de forma distinguible. Se pueden encontrar detalles adicionales y variaciones de esta composición en la sección de métodos de esta divulgación.

Kits

Esta divulgación también divulga kits para practicar los métodos objeto, como se ha descrito anteriormente. En algunas formas de realización, un kit puede contener al menos: reactivos para circularizar fragmentos seleccionados de una forma específica de secuencia y después realizar amplificación por círculo rodante de los productos circularizados. Por ejemplo, una o más enzimas de restricción, una ligasa, y uno o más oligonucleótidos que pueden actuar como un molde para circularizar los productos, una polimerasa que desplaza la hebra para amplificar los productos circularizados por RCA, uno o más oligonucleótidos marcados para marcar los productos de RCA, y una membrana capilar porosa, por ejemplo, una membrana de óxido de aluminio anódico, como se ha descrito anteriormente. Los varios componentes del kit pueden estar presentes en envases separados o ciertos componentes compatibles se pueden precombinar en un único envase, como se desee. Se pueden encontrar detalles adicionales y variaciones de componentes de este kit en la sección de métodos de esta divulgación.

Además de los componentes mencionados anteriormente, los kits objeto pueden además incluir instrucciones para usar los componentes del kit para practicar los métodos objeto, es decir, instrucciones para el análisis de muestras. Las instrucciones para practicar los métodos objeto en general están registradas en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar impresas en un sustrato tal como papel o plástico, etc. Como tal, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del envase del kit o los componentes del mismo (es decir, asociado con el embalaje o subembalaje) etc. En otras formas de realización, las instrucciones están presentes como un fichero de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, por ejemplo, CD-ROM, disquete, etc. En aún otras formas de realización, las instrucciones reales no están presentes en el kit, sino que se proporcionan medios para obtener las

instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de la internet. Un ejemplo de esta forma de realización es un kit que incluye una dirección web donde se pueden ver las instrucciones y/o desde la que se pueden descargar las instrucciones. Como con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones está registrado en un sustrato adecuado.

5

Formas de realización

A continuación, se describe una implementación ejemplar del método.

10 En algunas formas de realización, el método puede comprender: (a) filtrar una muestra líquida que contiene productos de amplificación por círculo rodante (RCA) marcados con fluorescencia usando una membrana porosa de óxido de aluminio anódico, produciendo de esta manera una matriz de productos de RCA en la membrana; y (b) determinar la cantidad de productos de RCA marcados en el área de la membrana, proporcionando de esta manera una estimación de la cantidad de productos de RCA marcados en la muestra. En algunas formas de realización, la etapa de determinación puede incluir contar el número de primeros y segundos productos de RCA marcados en el área. En otras formas de realización, la etapa de determinación puede incluir detectar una señal agregada del área.

15

En formas de realización, la etapa (a) del método se puede hacer al: (i) colocar la muestra en la membrana porosa de óxido de aluminio anódico; y (ii) aplicar una fuerza que mueve la muestra a través de la membrana. En estas formas de realización, la fuerza puede ser una fuerza activa (una fuerza centrífuga, presión negativa o presión positiva) o una fuerza pasiva (que se puede aplicar por acción capilar o evaporación). En algunas formas de realización, el método puede comprender lavar la membrana porosa de óxido de aluminio anódico entre las etapas (a) y (b). En algunas formas de realización, la etapa de determinación puede comprender contar al menos 1.000 productos de RCA marcados en el área de la imagen.

20

25

En formas de realización, el diámetro interior de los poros en la membrana puede estar en el intervalo de 5 nm a 500 nm, independientemente, la distancia media entre los centros de poros adyacentes en la membrana puede estar en el intervalo de 50 nm a 1000 nm. En formas de realización, la distancia media entre los bordes de poros adyacentes en la membrana puede estar en el intervalo de 10 nm a 500 nm. En algunas formas de realización, la muestra puede contener al menos una primera y una segunda población de productos de RCA marcados, en donde la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados están marcados de forma distinguible. En estas formas de realización, los métodos pueden comprender además imagenología de la primera y segunda poblaciones de los productos de RCA marcados para producir una o más imágenes (por ejemplo, una primera imagen y una segunda imagen, respectivamente). Estos métodos pueden comprender (i) contar el número de productos de RCA marcados en un área de la primera imagen y (ii) contar por separado el número de productos de RCA marcados en un área, por ejemplo, la misma área, de la segunda imagen, proporcionando de esta manera una estimación del número de la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados en la muestra. Esta forma de realización puede además comprender comparar la cantidad de primeros productos de RCA marcados en la muestra con la cantidad de segundos productos de RCA marcados en la muestra.

30

35

40

También se divulga una composición que comprende: a) una membrana capilar porosa; y b) una matriz de productos de amplificación por círculo rodante (RCA) marcados con fluorescencia en una superficie de la membrana. En algunas formas de realización, la membrana capilar porosa puede ser una membrana de óxido de aluminio anódico porosa. En algunas formas de realización, la matriz puede comprender al menos 1.000 productos de RCA. En algunas formas de realización, la composición puede comprender múltiples matrices de productos de RCA marcados con fluorescencia, en donde las múltiples matrices están en la superficie de la membrana y marcadas de forma distinguible. Se puede encontrar una descripción de cada uno de estos elementos, así como elementos opcionales que pueden estar presentes en la composición en la descripción anterior.

45

50

También se divulga un kit que comprende: a) una membrana capilar porosa; y b) reactivos para circularizar ADN y realizar amplificación por círculo rodante (RCA); y c) reactivos para marcar productos de RCA. Se puede encontrar una descripción de cada uno de estos elementos, así como elementos opcionales que pueden estar presentes en el kit en la descripción anterior.

55 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no se pretende que limiten el ámbito de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los experimentos siguientes son todos o los únicos experimentos realizados.

60

Ejemplo 1

Uso de un filtro de OAA

65

Introducción

La primera etapa en muchas aplicaciones de diagnóstico molecular es convertir el material biológico de un paciente tal como ADN a un biomarcador eficaz. El ADN se extrae, con frecuencia se purifica y convierte además en moléculas sustitutas, tal como productos de círculo rodante (RCP), que se pueden medir o cuantificar. La detección de estas moléculas sustitutas con frecuencia está ayudada por la unión específica de colorantes fluorescentes. Se pueden unir diferentes colorantes a diferentes marcadores sustitutos, lo que permite la detección multiplex incluso en mezclas complejas. La deposición a superficies planares, tal como placas o cubreobjetos de vidrio, permite contar las moléculas marcadas por microscopía o escaneado.

Un desafío particular viene cuando las muestras están en baja concentración en una solución y es difícil depositar números suficientes de las moléculas para la enumeración exacta. Recubrir portaobjetos de vidrio con agentes tal como poli-l-lisina (PLL), amino-silanos o similares ha demostrado ser un medio eficaz de mejorar la deposición para marcadores sustitutos compuestos principalmente de ADN (véase, por ejemplo, el documento PCT/US2014/06771, presentado el 26 de noviembre, 2014 y el documento PCT/US2014/067719, presentado el 26 de noviembre, 2014). Esto mejora la eficacia de la deposición en algún grado, sin embargo, muchas moléculas permanecen en solución y no se incluyen en el análisis posterior. En un esfuerzo para aumentar el rendimiento de la deposición de biomarcadores marcados con fluorescencia a una superficie planar, se implementó el siguiente método de filtración.

Materiales y métodos

Dispositivos: las membranas de óxido de aluminio se unieron a superestructuras de placas con pocillos que o bien se crearon internamente o se compraron de Ibidi (parte# 81201).

Las placas recubiertas de amino-silano (placas de fondo de vidrio de 96 pocillos SuperAmina, part# M96M) se compraron de ArrayIt Corporation.

Se crearon dos productos de amplificación por círculo rodante separados usando métodos previamente descritos (documento PCT/US2014/06771). Una reacción de RCA se marcó por hibridación de un oligonucleótido de detección complementario que contenía un marcador 5' Atto 550, la otra reacción de RCA se marcó de una manera similar con 5' Atto 647N. Las reacciones de RCA se mezclaron en una mezcla 50:50 a concentración 50 fM.

Para las placas de vidrio, se hicieron alícuotas de 100 ul de la reacción en 3 pocillos de la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 16 horas. Otra serie de 3 pocillos se incubaron durante 90 segundos. Después de las incubaciones, los pocillos se enjuagaron dos veces con SSC 2x y se dejaron secar.

Para las membranas, se añadieron muestras de 100 ul a las placas con fondo de membrana, y las placas se colocaron después en papel de transferencia (VWR part# 28298-022). Las muestras pasaron a través de la membrana de óxido de aluminio en aproximadamente 90 segundos. La placa con fondo de membrana se retiró del papel de transferencia, y se añadieron 2 gotas de reactivo anti-desvanecimiento prolongado (Life Technologies) a cada pocillo para hacerlos transparentes.

Se hizo imagenología para ambos formatos en un microscopio Olympus X81 con un objetivo de 20X y una cámara Hamamatsu Orca. La imagenología se hizo teselando 9x9 imágenes para cubrir el fondo entero de cada pocillo. Las imágenes se analizaron y los productos de RCA se contaron usando software construido expresamente internamente.

Resultados

Los resultados se resumen en la figura 3. Cuando se incubó durante 16 horas, la deposición en las placas de vidrio produjo una media por imagen de 2.000 a 4.000 cuentas para los productos de RCA marcados con Atto 550. Para Atto 647N, las cuentas medias por imagen estuvieron entre 2.000 y 3.000 cuentas. La incubación durante 90 segundos en las placas de vidrio produjo un recuento medio por imagen de entre 500 y 2.500 cuentas para ambos canales. En contraste, la incubación/deposición en la placa de óxido de aluminio produjo una media por imagen de 6.000 a 10.000 cuentas para los RCP marcados con Atto 550 y entre 6.000 y 9.000 cuentas para los productos de RCA marcados con 647N.

Los datos demuestran que la deposición en la membrana de óxido de aluminio produce aproximadamente 4 veces más cuentas que cuando se depositó en la placa de vidrio durante el mismo intervalo de tiempo de 90 segundos. Si se aumenta el tiempo de incubación a 16 horas para la placa de vidrio, el resultado es un aumento de los productos de RCA que se detectan en la placa de vidrio, sin embargo, todavía 2,5 veces menor que lo observado a 90 segundos en el óxido de aluminio.

Ejemplo 2

Métodos de detección multiplex

Materiales y métodos

Dispositivos: las membranas de óxido de aluminio con poros de 20 nm se unieron a superestructuras de placas de 96 pocillos que fueron producidas personalizadas por 4titude Ltd., RU.

5 En este experimento multiplex, se usaron mezclas de ADN de 2 líneas celulares como el material de partida genético. El ADN de la línea celular contenía o bien 2 copias del cromosoma 21 (dotación genética normal) o líneas celulares que contenían 3 copias del cromosoma (trisomía 21). El ADN extraído de las líneas celulares se mezcló en las siguientes proporciones 100:0, 95:5, 90:10, 0:100. Cada mezcla de ADN se digirió primero usando enzimas de restricción, se hibridó y ligo a un conjunto de sondas, y posteriormente se amplificó enzimáticamente por RCA como se ha descrito previamente (véase los documentos WO2015083001 y WO2015083002). Se añadieron dos oligonucleótidos de detección específicos de cromosomas (Atto 550 para el cromosoma 18, Atto 647 para el cromosoma 21) a cada mezcla y se dejó hibridar marcando de esta manera con fluorescencia los productos de RCA específicos de cromosoma en cada muestra.

10
15 Después del marcaje, se añadieron muestras de 100 ul a placas con el fondo de membrana, y las placas se colocaron después en un colector de vacío (Supleco part#66879-U). Las muestras se pasaron a través de la membrana de óxido de aluminio en aproximadamente 90 segundos. La placa con fondo de membrana se lavó dos veces con 400 ul de SSC 0,5X, después se dejó secar. Se aplicaron después trescientos microlitros de agente humectante/fijador a cada pocillo para hacerlos transparentes y para fijar los productos de RCA a la membrana.

20 Se hizo imagenología en un microscopio Olympus X81 con un objetivo 20X y una cámara Hamamatsu Orca. La imagenología se hizo teselando 10x10 imágenes para cubrir el fondo entero de cada pocillo. Las imágenes se analizaron y los productos de RCA se contaron usando software interno construido expresamente.

25 *Resultados*

Los resultados se resumen en la figura 4. Las cuentas medias por imagen para las 91 muestras incluidas en el experimento variaron desde 300 a ligeramente más de 5000 cuentas por imagen. Los histogramas claramente muestran una diferencia en proporción de cuentas entre los canales de 550 y 647 en la mezcla de proporción 0:100 (los últimos 22 replicados), sin embargo, es más difícil de discernir, de la figura sola, las diferencias en proporción en las muestras del 0, 5 & 10%. La figura 5 es un gráfico de la proporción entre las cuentas para los dos canales frente a la composición de la mezcla de líneas celulares. En este gráfico la tendencia está claramente representada, ejemplificando el desplazamiento de proporción relativa en cuentas que sigue la proporción de aporte de muestras de ADN de línea celular.

35 Los datos demuestran que la deposición en la membrana de óxido de aluminio produce aproximadamente 4 veces más cuentas que cuando se depositó en la placa de vidrio durante el mismo intervalo de tiempo de 90 segundos. Si se aumenta el tiempo de incubación a 16 horas para la placa de vidrio, el resultado es un aumento de los productos de RCA que se detectan en la placa de vidrio, sin embargo, todavía 2,5 veces menor que lo observado a 90 segundos en el óxido de aluminio.

40

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis de muestras, que comprende:
 - 5 (a) filtrar una muestra líquida que contiene productos de amplificación por círculo rodante (RCA) usando una membrana capilar porosa, produciendo de esta manera una matriz de los productos de RCA en la membrana; en donde la muestra contiene al menos una primera población de productos de RCA marcados y una segunda población de productos de RCA marcados, en donde la primera y segunda poblaciones de productos de RCA marcados están marcados de forma distinguible; y
 - 10 (b) determinar la cantidad de la primera población marcada de productos de RCA y la cantidad de la segunda población marcada de productos de RCA en un área de la membrana,

en donde la etapa de determinación (b) incluye contar el número de primeros y segundos productos de RCA marcados en el área.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de determinación (b) además incluye detectar una señal agregada del área.
- 20 3. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la membrana capilar porosa es una membrana porosa de óxido de aluminio anódico.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde los productos de RCA se marcan de forma distinguible por hibridación de oligonucleótidos marcados con fluorescencia a los productos de RCA antes de la etapa (a).
- 25 5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el método comprende imagenología de un área de la membrana para producir una o más imágenes y determinar el número de los productos de RCA marcados individuales en la una o más imágenes.
- 30 6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa (a) se hace al:
 - (i) colocar la muestra en la membrana capilar porosa; y
 - (ii) aplicar una fuerza que mueve la muestra a través de la membrana.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en donde la fuerza es una fuerza activa o una fuerza pasiva.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la fuerza activa es una fuerza centrífuga, presión negativa o presión positiva.
9. El método de la reivindicación 7, en donde la fuerza pasiva se aplica por acción capilar o evaporación.
- 40 10. El método de cualquier reivindicación anterior, que además comprende lavar la membrana capilar porosa entre las etapas (a) y (b).
- 45 11. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa de contar comprende contar al menos 1.000 productos de RCA marcados en el área de la membrana.
12. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el diámetro interior de los poros en la membrana está en el intervalo de 2 nm a 500 nm.
- 50 13. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la distancia media entre los centros de poros adyacentes en la membrana está en el intervalo de 50 nm a 1000 nm.
14. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la distancia media entre los bordes de poros adyacentes en la membrana está en el intervalo de 10 nm a 500 nm.
- 55 15. El método de cualquier reivindicación anterior, que además comprende comparar el número de los primeros productos de RCA marcados en la muestra con el número de los segundos productos de RCA marcados en la muestra.
- 60 16. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la membrana capilar porosa se hace transparente usando un agente humectante entre las etapas (a) y (b).
- 65 17. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra líquida es una muestra de ADN sin células obtenido de sangre de una mujer embarazada.

18. Uso de un método según la reivindicación 17 en la detección de anomalías cromosómicas en un feto en desarrollo de dicha mujer embarazada.

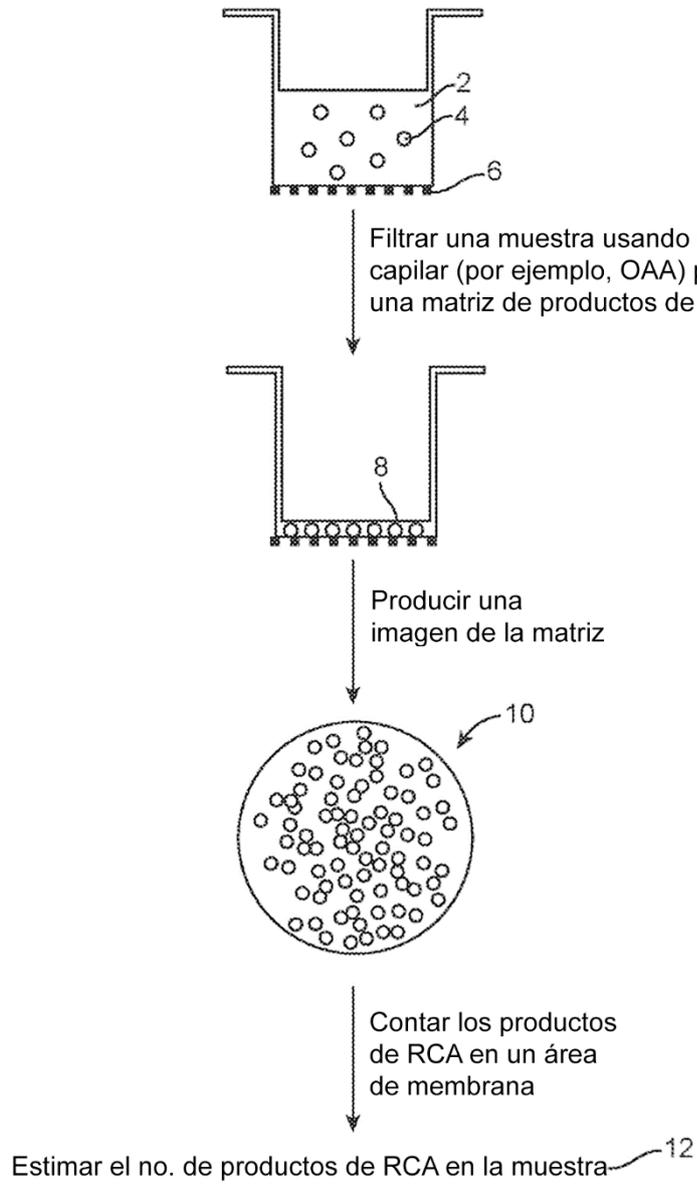


FIG. 1

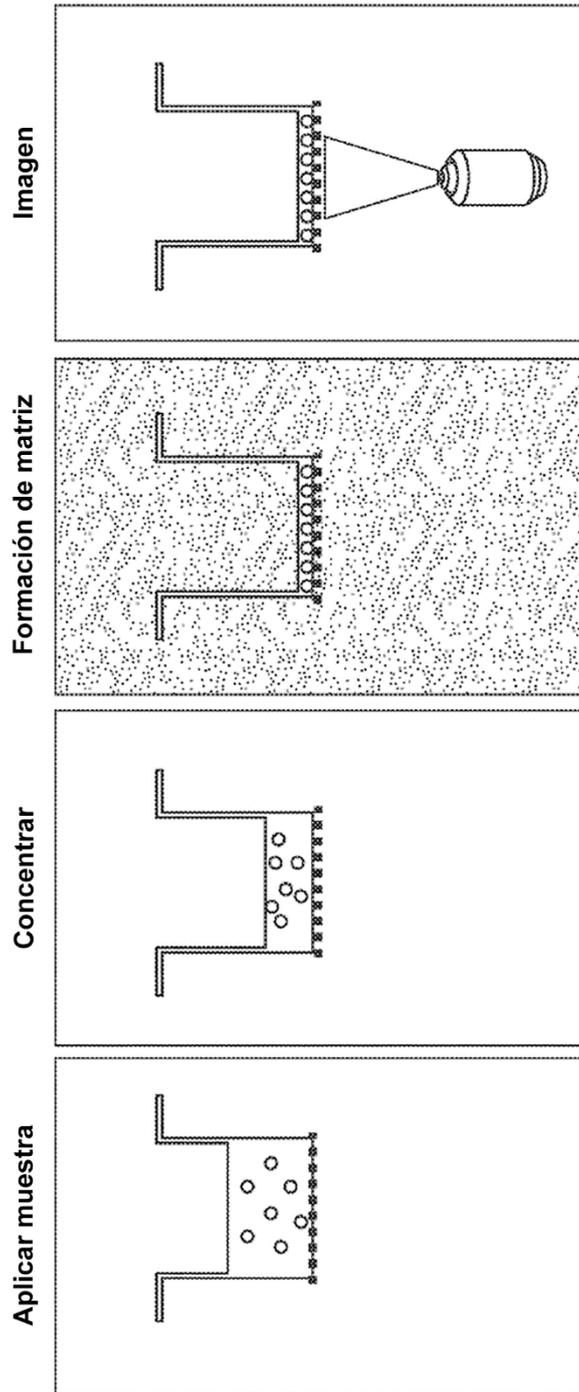


FIG. 2

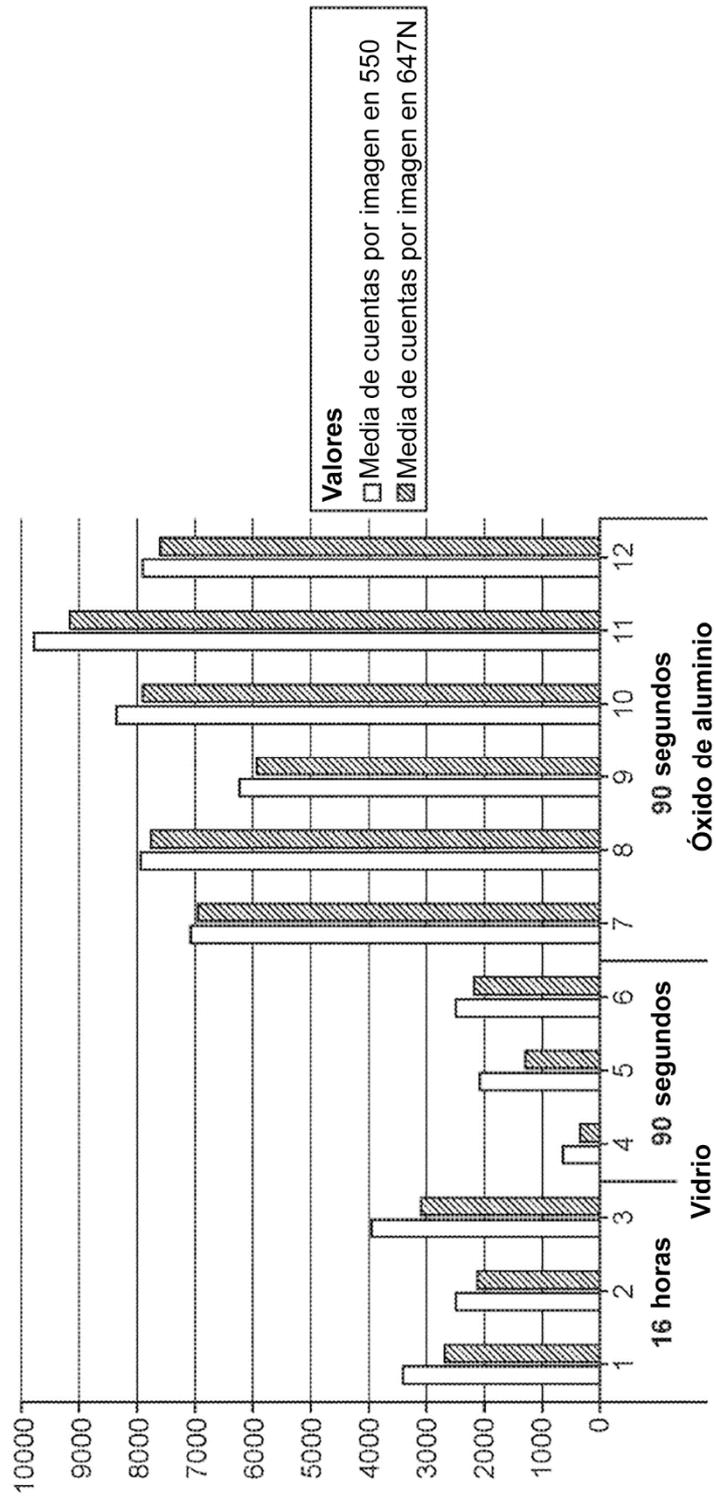


FIG. 3

Figura 5 - Proporción (normalizada al 0%)

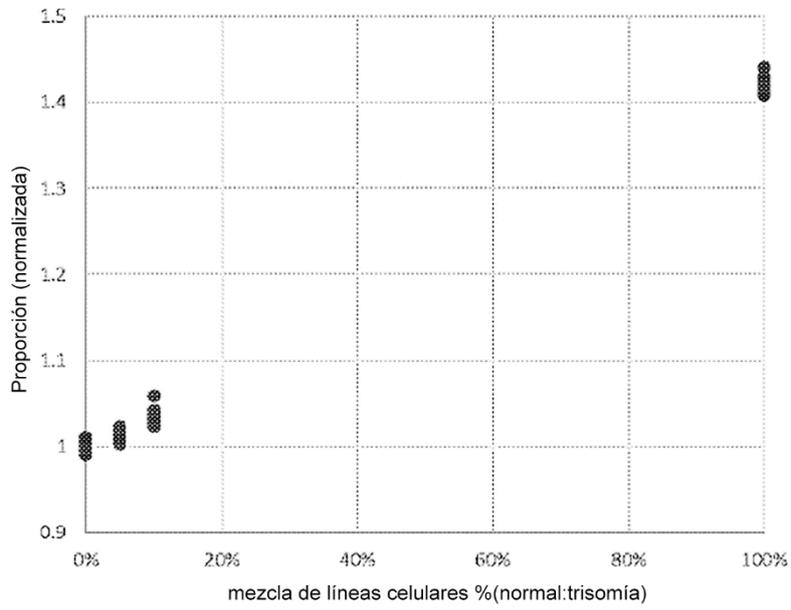


FIG. 5