



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 600**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/073** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06727061 .1**

96 Fecha de presentación : **10.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1891204**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **Método de enriquecimiento de células fetales.**

30 Prioridad: **10.05.2005 GB 0509500**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.09.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.09.2010**

73 Titular/es: **Revealcyte**  
**21 Wilson Street**  
**London EC2M 2TD, GB**

72 Inventor/es: **Levicar, Natasa y**  
**Gordon, Myrtle**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 344 600 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de enriquecimiento de células fetales.

5 La presente invención está relacionada con un método para enriquecer células fetales en una muestra de sangre materna y con un método para obtener una muestra analizable de células fetales. La muestra obtenida mediante los métodos de la presente invención es particularmente útil para el diagnóstico fetal no invasivo y la determinación del sexo.

10 Existe una gran demanda de diagnóstico fetal no invasivo y de determinación del sexo. Alrededor del 0,7% de todos los niños nacidos vivos tienen una anomalía congénita asociada con un defecto cromosómico y el diagnóstico prenatal de tales defectos es por lo tanto de gran interés. Ejemplos de desórdenes cromosómicos que pueden detectarse (si están presentes) en las células fetales incluyen los siguientes síndromes (Edwards, Patau, Downs, DiGeorge, Wolf-Hirschom, Cri du chat) y varios estados causados por microdeleciones.

15 Los procedimientos actuales de diagnóstico prenatal fetal incluyen la amniocentesis y la toma de muestras de vellosidades coriónicas. La amniocentesis implica la inserción de una aguja a través del abdomen de la embarazada hasta el útero y la extracción de líquido amniótico del saco que rodea el feto. La toma de muestras de las vellosidades coriónicas (CVS) se realiza insertando un catéter o aguja en la placenta y extrayendo una pequeña muestra de tejido. Estos procedimientos son invasivos y en consecuencia causan molestias a la madre e implican un riesgo, particularmente para el feto. El riesgo de aborto oscila entre alrededor del 0,5% y el 1% pero puede llegar hasta el 2%. Algunos estudios indican que la CVS puede causar defectos en los dedos de pies y manos del niño. La amniocentesis se realiza durante o tras la semana 15 de embarazo y la CVS entre la semana 10 y la 12 para minimizar el riesgo para el feto. Sería preferible poseer un método que pudiera realizarse en una fase anterior del embarazo. El coste de estos procedimientos también es considerable. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos alternativos no invasivos. El análisis de células fetales a partir de sangre periférica materna representa un método no invasivo.

20 Toda una serie de células fetales (por ejemplo, eritroblastos, linfocitos) entran en el torrente sanguíneo materno durante el embarazo en pequeñas cantidades y la presencia de células fetales en la sangre periférica materna se ha determinado mediante muchos estudios. Sin embargo, la proporción de células fetales en sangre periférica materna normal es normalmente muy baja, y oscila de  $1:10^5$  a  $1:10^9$ . Esta proporción es demasiado baja para permitir un análisis directo de las células fetales.

25 Puede realizarse un análisis indirecto utilizando técnicas de DNA como la amplificación del DNA fetal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, puede utilizarse la PCR para analizar la presencia en una muestra de sangre materna de un gen de herencia exclusivamente paterna como el gen sry (que se localiza en el cromosoma Y) o, si la madre es rhesus negativa, el gen rhesus. Sin embargo, como esta aproximación es indirecta no es adecuada para todos los tipos de aplicaciones deseadas, por ejemplo no puede utilizarse para el diagnóstico de anomalías cromosómicas fetales como las aneuploidías en células individuales de origen fetal.

30 Por el contrario, los métodos directos permiten la detección de una anomalía genética así como la determinación del sexo en células individuales.

35 El análisis directo de células fetales requiere de un enriquecimiento de las células fetales en la muestra de sangre materna para obtener una muestra analizable. Se han puesto a prueba toda una serie de métodos anteriormente.

40 Muchos grupos han intentado expandir células fetales como progenitores eritroides fetales o progenitores hematóyéticos fetales a través de cultivo (por ejemplo, Chen *et al.*, 1998, Manotaya *et al.*, 2002 y Campagnoli *et al.* 2002). Sin embargo, los métodos de cultivo poseen una baja probabilidad de éxito, especialmente en la detección de células fetales en sangre materna antes de la semana 16 de gestación. Además, los métodos de cultivo son costosos en tiempo ya que son necesarias unas 2-4 semanas de incubación antes de que las células fetales puedan analizarse. También existe la pequeña posibilidad de que el genotipo de las células fetales pueda sufrir cambios a medida que las células pasan por ciclos repetitivos de división celular durante el paso de cultivo.

45 Otros métodos implican la utilización de anticuerpos que se unen a las células fetales. Los anticuerpos pueden inmovilizarse (Mueller *et al.*, 1990, "Isolation of fetal tropoblasts cells from peripheral blood of pregnant women" The Lancet 336: 197-200) o marcarse con porciones de unión que permiten la separación de células marcadas de las no marcadas (por ejemplo Herzenberg *et al.*, 1979 "Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting", Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 76:1453-1455 y Little *et al.* - 1997, Blood, vol 89, N° 7, págs. 2347-2358).

50 La WO 2005/123779 proporciona anticuerpos que se unen preferentemente a las células fetales en lugar de a las células maternas y describe los métodos para utilizar tales anticuerpos para el aislamiento de células fetales.

55 Los antígenos de los grupos de diferenciación (CD) son un grupo de marcadores que normalmente se utilizan como diana de anticuerpos monoclonales específicos para aislar células que son portadoras de un antígeno CD concreto (por ejemplo, Bianchi *et al.*, 1996 Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 93: 705-708). Este método implica la incubación de las células con un anticuerpo monoclonal adecuado marcado, por ejemplo con un colorante fluorescente o una cuenta paramagnética, seguida de la separación de las células unidas al anticuerpo de las no unidas utilizando la tecnología

## ES 2 344 600 T3

de separación celular activada por fluorescencia o separación celular activada magnéticamente, respectivamente. Los resultados obtenidos en estos estudios no fueron satisfactorios, ya que no daban lugar a una proporción de células fetales suficiente para un análisis fiable. Esto ocurre porque hasta la fecha, no se ha identificado ningún marcador celular adecuado que sea exclusivo de las células fetales y que pueda ser reconocido mediante anticuerpos. Los anticuerpos que se han probado hasta la fecha, incluyendo los anticuerpos frente a los antígenos CD, reconocen tanto las células fetales como las maternas.

Las proporciones entre células maternas y células fetales obtenidas con estos anticuerpos no son satisfactorias, con muestras que contienen proporciones tan bajas de células fetales que no son adecuadas para un análisis fiable.

Por lo tanto existe la necesidad de un método para obtener una muestra que contenga una concentración analizable de células fetales. Los presentes inventores han descubierto de forma inesperada que mediante el aislamiento de la población de células CD34+ de la sangre materna y seleccionando aquellas células capaces de adherirse a un soporte sólido, puede obtenerse una proporción significativa y clínicamente útil de células fetales. El soporte sólido preferiblemente debe ser transparente y poseer buenas propiedades ópticas para la inspección microscópica. El soporte sólido posee o consiste en una superficie de vidrio o plástico. Preferiblemente, el soporte sólido es plástico adecuado para cultivo tisular. Los recipientes de plástico adecuado para cultivo tisular apropiados son los que fabrica Corning Incorporated, New York, USA. El soporte sólido puede estar recubierto con una sustancia adecuada, como proteínas, por ejemplo colágeno o fibronectina, glucosaminoglucanos, por ejemplo heparán sulfato o ácido hialurónico o carbohidratos complejos, sólo los recubrimientos que no estimulan de forma significativa la unión de las células no fetales se contemplan en la presente invención.

Las células fetales que están enriquecidas de acuerdo con este método son preferiblemente mononucleares, pequeñas (diámetro aproximado de 10 micras) con una morfología similar a la de un linfocito y con una proporción núcleo:citoplasma elevada.

Por lo tanto en un aspecto, se proporciona un método para enriquecer células fetales en una muestra de sangre materna en el que las células que son CD34+ y capaces de adherirse a un soporte sólido se seleccionan, y dicho método comprende, en cualquier orden:

- a) el enriquecimiento de las células CD34+ de la muestra; y
- b) la puesta en contacto de la muestra con un soporte sólido y recogida de las células que se adhieren a dicho soporte sólido separando las células que son capaces de resistir un lavado vigoroso sin liberarse del soporte, y dicho soporte sólido posee o consiste en una superficie de vidrio o plástico.

En una visión alternativa, la invención proporciona un método para preparar una muestra de células que está enriquecida en células fetales cuyo método comprende someter una muestra de sangre materna a un procedimiento que selecciona aquellas células que son CD34+ y son capaces de adherirse a un soporte sólido y dicho método comprende, en cualquier orden:

- a) el enriquecimiento de la muestra en células CD34+; y
- b) la puesta en contacto la muestra con un soporte sólido y recogida de las células que se adhieren a dicho soporte sólido separando las células que son capaces de resistir un lavado vigoroso sin liberarse del soporte, y dicho soporte sólido posee o consiste en una superficie de vidrio o plástico.

En una visión alternativa, la invención proporciona un método para obtener una muestra analizable de células fetales a partir de una muestra de sangre materna, cuyo método comprende, en cualquier orden:

- a) el enriquecimiento de la muestra en células CD34+; y
- b) la puesta en contacto de la muestra con un soporte sólido y recogida de las células que se adhieren a dicho soporte sólido separando las células que son capaces de resistir un lavado vigoroso sin liberarse del soporte, y dicho soporte sólido posee o consiste en una superficie de vidrio o plástico.

Estos dos pasos pueden realizarse en cualquier orden, pero preferiblemente el paso b) se realiza sobre el producto del paso (a), y por lo tanto la referencia a "la muestra" en el paso b) y en general a lo largo de la especificación (a no ser que claramente se indique de otro modo por el contexto) hace referencia a una fracción de la muestra inicial que ya se ha sometido a un enriquecimiento u otro paso, normalmente para seleccionar las células CD34+.

"Enriquecimiento" de una muestra en células de un determinado tipo o con ciertas propiedades se refiere a un aumento de la concentración y/o la proporción de células de ese tipo en relación a los niveles iniciales en la muestra. In el presente contexto enriquecimiento preferiblemente se refiere a un aumento en la proporción de células diana en relación a las células no diana en la muestra antes y después del paso o pasos del proceso de enriquecimiento. Claramente el enriquecimiento puede realizarse mediante un paso que elimine las células no diana u otros componentes de la muestra, es decir se realiza mediante la selección negativa, o más preferiblemente un paso de selección positiva que separa las células fetales de interés.

## ES 2 344 600 T3

El método de la invención se realiza preferiblemente obteniendo en primer lugar células que son CD34+ y luego seleccionando una subpoblación adherentes de las mismas. Sin embargo, los métodos en los que se eliminan en primer lugar las células no adherentes y a continuación se selecciona una subpoblación de las células adherentes que es CD34+ también son contemplados por el inventor.

5

Los métodos de enriquecimiento de células que poseen marcadores concretos de la superficie celular como CD34 son bien conocidos en la materia. Los métodos preferiblemente implicarán un ligando con afinidad por CD34.

El ligando con afinidad es preferiblemente un anticuerpo. Pueden utilizarse tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales, siendo preferibles los anticuerpos monoclonales. El ligando con afinidad debe ligarse, unirse o acomplejarse con el marcador diana (normalmente CD34 o un marcador que se coexpresa con CD34) de forma que se asegure que el ligando y la célula que posee el marcador diana pueden separarse de las células libres de ligando.

Preferiblemente, un marcador seleccionable que puede unirse al anticuerpo se pone en contacto con la muestra previamente, simultáneamente o tras poner en contacto la muestra con el anticuerpo. El marcaje puede consistir por ejemplo en cuentas magnéticas o un colorante fluorescente.

Convenientemente, los anticuerpos pueden estar conjugados con marcadores, como las cuentas magnéticas, que permiten una separación directa, biotina, que puede separarse con avidina o estreptavidina unida a un soporte, fluorocromos, que pueden utilizarse con un separador de células activado por fluorescencia, o similar, para facilitar la separación del tipo celular concreto. Preferiblemente la técnica utilizada no será indebidamente perjudicial para la integridad de las células, siendo preferible que la mayoría de los componentes intracelulares, en particular los ácidos nucleicos, permanezcan en el interior de las células.

Los procedimientos para la separación pueden incluir la separación magnética si se utilizan cuentas magnéticas, cromatografía de afinidad, los agentes citotóxicos unidos al anticuerpo o utilizados en conjunción con dicho anticuerpo, por ejemplo, el complemento y las citotoxinas, y la “fijación” con un anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, placa u otras técnicas adecuadas. Las técnicas que proporcionan una separación adecuada incluyen la separación celular activada por fluorescencia, que puede realizarse con un grado variable de sofisticación, por ejemplo una pluralidad de canales de color, canales de detección de ángulo bajo y dispersión de luz, canales de impedancia, etc.

Los métodos de la invención resultan en un enriquecimiento de células que son capaces de adherirse a ciertos soportes sólidos, claramente una forma simple de asegurar que las células poseen esta capacidad es mediante la selección de la subpoblación que es de hecho adherente. La adherencia, puede definirse como la capacidad de resistir un lavado vigoroso sin liberarse de l soporte sólido. Un lavado vigoroso puede comprender la inmersión con acciones de enjuague manual. Algunas células inevitablemente pueden perderse en el paso de lavado pero en general la capacidad de adherirse a lo largo de este paso de lavado resultará en un enriquecimiento significativo de las células fetales.

En una realización preferible, las células adherentes se seleccionan de la siguiente forma. La muestra de células se pone en contacto con el soporte sólido y se incuba durante un mínimo de 1 o 2 horas y hasta 18 horas, preferiblemente durante alrededor de 2-3 horas en un rango de temperatura de 20-38°C, preferiblemente 35-38°C, incluso más preferiblemente a 37°C. Más preferiblemente, la incubación se realiza a 37° durante alrededor de 2 horas. Las células que se adhieren al soporte sólido entonces se separan mediante la eliminación por lavado de cualquier célula no adherente. El paso de lavado puede realizarse con cualquier tampón o medio de cultivo celular adecuado. Una solución de lavado preferible es la HBSS (solución salina equilibrada de Hanks) pero otros medios adecuados son conocidos por el experto en la materia. Preferiblemente, la solución es acuosa e isotónica. El paso de lavado simplemente implica la inmersión del soporte sólido en la solución de lavado seguido por una o más acciones de enjuague intensas. Preferiblemente, se realizan al menos dos y más preferiblemente tres lavados vigorosos para eliminar tantas células no adherentes como sea posible.

50

La muestra sobre la que se realiza el método de la invención normalmente es una muestra de sangre periférica de un mamífero gestante. El método de la invención puede utilizarse por sí mismo o en combinación con otros procedimientos. El término “muestra de sangre materna” comprende una variedad de muestras, lo que incluye una muestra que se ha extraído del torrente sanguíneo materno sin posterior modificación y una muestra que se ha sometido a uno o más pasos de procesado. Preferiblemente, la muestra consiste en sangre periférica, es decir, sangre que se encuentra en la vasculatura de la circulación. Más preferiblemente, la muestra se ha procesado para eliminar el material no celular no deseado de la muestra. Por lo tanto, “muestra de sangre” también comprende las fracciones y partes parcialmente purificadas de sangre total, en particular las fracciones que están enriquecidas en células dendríticas o linfocitos.

En una realización preferible los métodos de la invención se realizan sobre la fracción mononuclear de la muestra de sangre materna. El experto en la materia conocerá la forma de obtener la fracción mononuclear. Por ejemplo, las células mononucleares pueden separarse de otros componentes de la sangre periférica mediante centrifugación, preferiblemente centrifugación con gradiente de densidad y más preferiblemente centrifugación con gradiente de densidad discontinuo. Preferiblemente la fracción mononuclear de la muestra de sangre se separa utilizando un gradiente de densidad Lymphoprep™ (Axis Shield). Así, los métodos preferibles de la invención comprenden un paso preliminar en el que la muestra se enriquece en células mononucleares. La fracción mononuclear incluirá tanto células fetales como los linfocitos maternos. Las células eritrocitarias maternas maduras tienen una mayor densidad y se separarán completamente o en gran parte.

65

## ES 2 344 600 T3

El método de la presente invención puede realizarse en una muestra de sangre de cualquier mamífero gestante. Preferiblemente, el mamífero es un mamífero humano, equino o bovino, más preferiblemente un humano. La muestra de sangre materna puede extraerse en cualquier momento tras las 7 semanas de gestación, preferiblemente entre la semana 10 y 20. La muestra de sangre puede ser de volumen tan pequeño como una gota obtenida de una punción en el dedo, pero preferiblemente es de al menos 1 ml, más preferiblemente de al menos 5 ml, por ejemplo 10 ml o 20 ml, pero también son adecuados volúmenes mayores. El método de la invención se realiza preferiblemente en muestras frescas, es decir entre 45-75 min., por ejemplo 1 hora, tras la extracción de la muestra de sangre. Sin embargo, el procesado también se puede retrasar hasta varias horas tras la extracción. La muestra se almacena preferiblemente a 4°C y puede almacenarse así de forma adecuada hasta 18 horas.

Una vez obtenida una muestra de células, esta puede secarse y fijarse en un soporte sólido y almacenarse a -20°C hasta varias semanas.

Utilizando el método de la presente invención, el inventor ha sido capaz de obtener muestra que contienen hasta un 10-30% de células fetales. Este nivel de enriquecimiento de células fetales no se ha descrito con anterioridad. Aquí se describe una muestra analizable de células fetales obtenidas de sangre periférica materna que comprende al menos un 10% de células fetales. Preferiblemente, la muestra comprende al menos un 15 o 20% de células fetales, por ejemplo 10-30%, más preferiblemente al menos un 25% o 30%. Aquí se describe una muestra de células que comprenden un 10-30% de células fetales y un 90-70% de células maternas. Debe apreciarse que tal muestra de células es de un único origen y no se consigue simplemente mezclando una muestra de células maternas y una muestra de células fetales.

También se describe un equipo para su utilización en los métodos de la invención que comprende a) un ligando de afinidad a CD34; y b) un soporte sólido.

Opcionalmente, el equipo también comprende una solución de lavado adecuada como un tampón, por ejemplo HBSS. Los ligandos y soportes adecuados se han descrito anteriormente.

El término “selección” como se utiliza aquí debe entenderse que significa una selección positiva o negativa. La selección positiva se refiere a retener o separar la población celular deseada y la selección negativa se refiere a la eliminación de la población celular no deseada.

Por “muestra analizable” se entiende una muestra que contiene un número suficiente de células fetales como para permitir un análisis directo de las células fetales como, por ejemplo, un análisis FISH. Preferiblemente, el número y proporción de células fetales en la muestra analizable debe ser suficientemente elevado como para proporcionar tasas de éxito clínicamente aceptable.

Las “células CD34+” son aquellas células que expresan el antígeno del grupo de diferenciación 34 y por lo tanto poseen la glucoproteína CD34 en su superficie celular. Se debe entender que una población o fracción celular CD34+ se refiere a una población de células que son predominantemente CD34+. Preferiblemente, la población CD34+ está sustancialmente libre de cualquier célula CD34-, por ejemplo comprende al menos un 80% de células CD34+, más preferiblemente al menos un 90% de células CD34+, más preferiblemente al menos un 95% o 98% de células CD34+.

El método de la presente invención es particularmente adecuado para obtener una muestra analizable de células fetales para el diagnóstico fetal no invasivo y la determinación del sexo. Aquí se describe un método de determinación del sexo fetal, que comprende someter una muestra de sangre materna enriquecida en células fetales como la descrita anteriormente, y preferiblemente obtenida de acuerdo con alguno de los métodos descritos anteriormente, a un procedimiento que permite distinguir entre las células de un niño y de una niña. Las células normalmente se distinguirán a nivel cromosómico, diferenciándose las células XX de las XY, por ejemplo mediante FISH.

También se describe un método para el diagnóstico de una anomalía genética fetal (es decir cualquier estado, sea hereditario o no, en el que se asocian características fenotípicas no deseadas con un genotipo concreto), y este método comprende poner en contacto una muestra de sangre materna enriquecida en células fetales como se ha descrito anteriormente, y preferiblemente obtenida de acuerdo con alguno de los métodos descritos anteriormente, con un agente capaz de distinguir entre las células normales a nivel genético y las células anómalas a nivel genético.

En otro aspecto, se proporciona un método para enriquecer una muestra de sangre materna en células fetales, en el que las células que son CD34+ y son capaces de adherirse a un soporte sólido se seleccionan como se ha descrito aquí, y en el que dichas células seleccionadas se someten a un análisis genético. Por “análisis genético” se entiende cualquier análisis del material genético de las células, lo que incluye el análisis del número, la forma y el tamaño de los cromosomas, la presencia o ausencia de genes o secuencias de ácido nucleico específicas, y el cribado de cualquier tipo de mutación como las deleciones, inserciones, mutaciones puntuales y similares. Preferiblemente, dicho análisis genético incluye el cribado de una anomalía genética fetal. Dicho análisis genético puede incluir también alternativamente la determinación del sexo.

La muestra de células fetales que puede obtenerse con el método de la presente invención es adecuada tanto para el análisis directo como para el indirecto. Ejemplos de métodos de análisis que pueden realizarse sobre las muestras que se obtienen mediante el método de la invención o, más genéricamente, en conjunto con los métodos de la presente invención se proporcionan a continuación, pero debe entenderse que el experto en la materia conocerá otros

## ES 2 344 600 T3

métodos de análisis que pueden realizarse sobre las muestras de la invención. Los métodos directos de análisis son preferibles e incluyen la FISH (hibridación *in situ* fluorescente). Por ejemplo, las sondas que se unen a los cromosomas X e Y respectivamente pueden utilizarse para determinar el sexo del feto. La FISH multicolor puede utilizarse para detectar anomalías cromosómicas en células fetales. Hay disponibles sondas específicas de cada cromosoma individual marcadas de un color diferente y pueden utilizarse para analizar el número y la forma de los cromosomas presentes en las células fetales. Se describen sondas adecuadas, por ejemplo, en Griffin, D.K., Handyside, A.H., Harper, J. *et al.* (1994) Clinical experience with preimplantation diagnose of sex by dual fluorescent *in situ* hybridisation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 11, 132-143; Munné, S., Tang, Y.X., Grifo, J. *et al.* (1994) Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence *in situ* hybridization. *Fertil. Steril.*, 61, 111-117; Staessen, C., Van Assche, E., Joris, H. *et al.* (1999) Clinical experience of sex determination by fluorescent *in situ* hybridization for preimplantation genetic diagnose. *Mol. Hum. Reprod.*, 5, 382-389.

Un método diferente de determinación del sexo que puede utilizarse adicionalmente o alternativamente es la amplificación mediante PCR del gen *sry* específico del sexo masculino. Previamente se han descrito cebadores adecuados, por ejemplo, Erdal y Barlas, *Turkish Journal of Medical Science* 30, 2000, págs. 501-503. Los cebadores adecuados también están disponibles a nivel comercial, por ejemplo en Fisher Life Science Catalog o Maxim Biotech.

Pueden utilizarse una serie de sondas diferentes/ métodos de visualización para detectar las diferentes anomalías genéticas que involucran trisomías o grandes deleciones. Para los síndromes causados por microdeleciones son preferibles las sondas específicas.

Los métodos adecuados para realizar un análisis de las células fetales son conocidos para el experto en la materia y se describen por ejemplo en las siguientes referencias, que también detallan trastornos genéticos concretos.

**Boghosian-Sell L et al.** Molecular mapping of the Edwards syndrome phenotype to two noncontiguous regions on chromosome 18. *Am J Hum Genet* 1994; 476-83.

**Helali N et al.** A case of duplications 13q32-->qter and deletion of 18p11.32-->pter with mild phenotype: Patau syndrome and duplications of 13q revisited. *J Med Genet* 1996; 33: 600-2.

**Witters I et al.** Rapid prenatal diagnose of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) *Prenat Diagn* 2002; 22: 29-33.

**Oskarasdottir S et al.** Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Arch Dis Child* 2004; 89: 148-51.

**Marinescu RC et al.** FISH analysis of terminal deletions in patients diagnosed with cri-du-chat syndrome. *Clin Genet* 1999; 56: 282-8.

En otras aplicaciones, una muestra enriquecida viable puede inducirse a dividirse y detener su crecimiento en la metafase del ciclo celular para obtener un análisis citogenético completo.

Además, las muestras enriquecidas pueden ser adecuadas cuando se realiza un cribado de sangre que se va a utilizar para su transfusión cuando son necesarias las transfusiones de glóbulos blancos nucleados. Las muestras también pueden utilizarse en el cribado de células dendríticas e infusiones de linfocitos de donante ya que estas también pueden resultar en la enfermedad de injerto contra huésped. También puede utilizarse médula ósea y sangre de cordón umbilical en los trasplantes para tratar estados de deficiencia hematológica y pueden realizarse los mismos métodos de enriquecimiento en tales muestras para realizar un análisis fenotípico, o más preferiblemente genotípico de las células fetales de la muestra.

La invención se describirá en detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

Las muestras de sangre se extrajeron de sangre periférica de una mujer embarazada al final del embarazo y de madres de hijos varones. La fracción celular mononuclear se separó de la muestra mediante centrifugación en gradiente de densidad Lymphoprep<sup>TM</sup> y se separó la fracción celular CD34 positiva de las células mononucleares utilizando la tecnología MiniMACS (Miltenyi Biotech). Para ello, las células se marcaron en primer lugar con un anticuerpo monoclonal anti-CD34 y luego con microcuentas paramagnéticas. Las células marcadas se cargaron en una columna que se mantuvo en un imán, de forma que las células no marcadas se eluyeron y luego las células marcadas se liberaron separando la columna del imán. Las células CD34 positivas purificadas se incubaron en un portaobjetos de microscopio de plástico para el cultivo de tejidos o de vidrio a 37°C durante al menos 2 horas. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS). Los portaobjetos de secaron al aire y se fijaron en metanol: ácido glacial acético durante 30 minutos. En ese momento los portaobjetos pueden almacenarse durante varias semanas previamente a su análisis envueltos en una lámina de papel de aluminio y congelados a -20°C.

## ES 2 344 600 T3

### *Hibridación in situ fluorescente (FISH)*

Los portaobjetos que se habían almacenado congelados se dejaron llegar a temperatura ambiente antes de desenvolverlos. Las sonda de marcaje dual X/Y se calentó a 37°C. Los portaobjetos se deshidrataron mediante una serie de alcohol etílico (75%, 95%, 100% - 1 minuto en cada uno) y luego se secaron al aire. Se depositaron 5 µl de sonda en el centro de las células en el portaobjetos. La preparación se cubrió con un pequeño cubreobjetos que se selló a lo largo de todos su perímetro con solución gomosa. El portaobjetos se situó en una plancha a 73°C durante 5 minutos y luego en una cámara húmeda a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se eliminaron la solución gomosa y el cubreobjetos y se realizó el montaje del portaobjetos con una solución antifade de DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol.

### *Análisis de células fetales en la muestra enriquecida*

Los portaobjetos se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus conectado a un ordenador Macintosh. Al menos se analizaron ocularmente 50 células por muestra. La sonda del cromosoma Y estaba marcada con SpectrumGreen y la sonda del cromosoma X con SpectrumOrange. Por lo tanto, las células masculinas resultan en una señal verde y una roja, y las células femeninas resultan en dos señales rojas. En las muestras analizadas, un 10-27% de las células contenían el cromosoma Y masculino.

### Ejemplo 2

La Tabla 1 a continuación lista algunas anomalías cromosómicas que pueden detectarse en las células fetales enriquecidas de acuerdo con los métodos de la presente invención.

TABLA 1

| Síndrome       | Características citogenéticas y fenotípicas  |
|----------------|--|
| Edwards        | Trisomía 18; 1/3000 nacimientos; retraso mental; dismorfismo; supervivencia < 1 año                    |
| Patau          | Trisomía 13; 1/5000; retraso motor/ mental; supervivencia < 6 meses                                    |
| Downs          | Trisomía 21; mongolismo  |
| DiGeorge       | Delección 22q11; malformación cardiaca; anomalías endocrinas/ inmunes; atributos faciales              |
| Wolf-Hirschorn | Delección 4p; 1/50000 nacimientos; defectos de fusión de la línea media; 34% de mortalidad en 2 años   |
| Cri du chat    | Delección 5p; limitación mental; llanto característico; varios cromosomas; características dismórficas |

Pueden utilizarse una serie de diferentes sondas/ métodos de visualización para detectar las diferentes enfermedades que involucran trisomía o grandes deleciones. Para los síndromes causados por microdeleciones son necesarias sondas específicas.

Los métodos adecuados para realizar un análisis de las células fetales son conocidos para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias, que también detallan anomalías genéticas particulares:

## ES 2 344 600 T3

**Boghosian-Sell L et al.** Molecular mapping of the Edwards syndrome phenotype to two noncontiguous regions on chromosome 18. *Am J Hum Genet* 1994; 476-83.

5 **Helali N et al.** A case of duplications 13q32-->qter and deletion of 18p11.32-->pter with mild phenotype: Patau syndrome and duplications of 13q revisited. *J Med Genet* 1996; 33: 600-2.

**Witters I et al.** Rapid prenatal diagnose of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) *Prenat Diagn* 2002; 22: 29-33.

10 **Oskaradottir S et al.** Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Arch Dis Child* 2004; 89: 148-51.

**Marinescu RC et al.** FISH analysis of terminal deletions in patients diagnosed with cri-du-chat syndrome. *Clin Genet* 1999; 56: 282-8.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 344 600 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para enriquecer células fetales en una muestra de sangre materna en el que las células que son CD34+ y son capaces de adherirse a un soporte sólido se seleccionan, y dicho método comprende, en cualquier orden:
- a) el enriquecimiento de la muestra en células CD34+; y
  - b) la puesta en contacto de la muestra con un soporte sólido y recogida de las células que se adhieren a dicho soporte sólido separando las células capaces de resistir un lavado vigoroso sin liberarse del soporte, en el que dicho soporte sólido posee o consiste en una superficie de vidrio o plástico.
- 10
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso (b) se realiza sobre el producto del paso (a).
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso (a) se realiza sobre el producto del paso (b).
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que se utiliza un ligando con afinidad por CD34.
- 20 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que dicho ligando con afinidad es un anticuerpo.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 en el que un marcador seleccionable que puede unirse a dicho ligando con afinidad se pone en contacto con la muestra previamente, de forma simultánea, o tras poner en contacto la muestra con dicho ligando con afinidad.
- 25 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho marcador seleccionable consiste en una cuenta magnética o un colorante fluorescente.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 4 a 7 en el que dicho ligando con afinidad está conjugado con un marcador como las cuentas magnéticas, biotina o los fluorocromos.
- 30 9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que la selección de células adherentes comprende poner en contacto la muestra con un soporte sólido e incubar durante entre 1 y 18 horas a un rango de temperatura de 20-38°C.
- 35 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el que el método se realiza sobre la fracción mononuclear de la muestra de sangre materna.
- 40 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dichas células seleccionadas se someten a un análisis genético.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho análisis genético incluye la determinación del sexo.
- 45 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que dicho análisis genético incluye el cribado de una anomalía genéticas fetal.
- 50
- 55
- 60
- 65