

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

|                                                                                      |                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------|
| (22) Data de pedido: <b>2010.01.07</b>                                               | (73) Titular(es):<br><b>ARCEDI BIOTECH APS</b>           |           |
| (30) Prioridade(s): <b>2009.01.07 DK 200900020</b><br><b>2009.10.04 DK 200901084</b> | <b>DANDYVEJ 19 7100 VEJLE</b>                            | <b>DK</b> |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2011.11.16</b>                                 | (72) Inventor(es):<br><b>BRITTA CHRISTENSEN</b>          | <b>DK</b> |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2014.12.31</b><br><b>074/2015</b>                   | <b>ANDREAS ECKELT</b>                                    | <b>DE</b> |
|                                                                                      | <b>STEEN KO&amp;#824;LVRAA</b>                           | <b>DK</b> |
|                                                                                      | <b>MARIE BRINCH</b>                                      | <b>DK</b> |
|                                                                                      | <b>RIPUDAMAN SINGH</b>                                   | <b>DK</b> |
|                                                                                      | (74) Mandatário:<br><b>NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO</b> |           |
|                                                                                      | <b>RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA</b>          | <b>PT</b> |

(54) Epígrafe: **ENRIQUECIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS FETAIS EM SANGUE MATERNO E LIGANDOS PARA ESSE USO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM ENRIQUECIMENTO E/OU IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS FETAIS NUMA AMOSTRA DE SANGUE MATERNO USANDO LIGANDOS ESPECÍFICOS DE CÉLULAS FETAIS E/OU SONDAS DE HIBRIDIZAÇÃO ESPECÍFICAS DE CÉLULAS FETAIS. CÉLULAS FETAIS ENRIQUECIDAS OU IDENTIFICADAS PODEM SER SUJEITAS AOS PASSOS DE DETECÇÃO OU DIGNÓSTICO, PORTANTO A PRESENTE INVENÇÃO PERMITE DIAGNÓSTICOS PRÉ-NATAIS NÃO-INVASIVOS.

## **RESUMO**

### **"ENRIQUECIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS FETAIS EM SANGUE MATERNO E LIGANDOS PARA ESSE USO"**

A presente invenção relaciona-se com enriquecimento e/ou identificação de células fetais numa amostra de sangue materno usando ligandos específicos de células fetais e/ou sondas de hibridização específicas de células fetais. Células fetais enriquecidas ou identificadas podem ser sujeitas aos passos de detecção ou diagnóstico, portanto a presente invenção permite diagnósticos pré-natais não-invasivos.

## **DESCRIÇÃO**

### **"ENRIQUECIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS FETAIS EM SANGUE MATERNO E LIGANDOS PARA ESSE USO"**

#### **Antecedentes**

A análise de células fetais para detecção prematura de doenças fetais e anomalias genéticas é realizada em relação a muitas gravidezes, em particular quando a idade da mãe é elevada (35 anos ou mais) ou quando são conhecidas doenças genéticas na família. As células fetais podem ser obtidas por amniocentese, a remoção de líquido amniótico da cavidade amniótica dentro do saco amniótico ou por biópsia coriônica, quando as biópsias são recolhidas da placenta, chamada amostragem invasiva.

Exames de aneuploidia pré-natal empregam análise tradicional de cromossomas ou sondas de ADN específicas de cromossomas para esclarecer aberrações numéricas dos cromossomas mais frequentemente anormais, em particular cromossomas 13, 18, 21, X e Y no feto.

Devido à invasividade dos métodos de amostragem acima descritos e ao risco de aborto, seria vantajoso realizar o diagnóstico fetal com um procedimento não-invasivo, tal como por exemplo com o uso de uma amostra de sangue materno.

Durante a gravidez, uma variedade de tipos de células de origem fetal atravessam a placenta e circulam no sangue maternal periférico. A praticidade de usar células fetais na circulação materna para fins de diagnóstico tem sido prejudicada pelo facto das células fetais estarem presente no sangue materno em números muito limitados, números registados têm sido de uma célula fetal por  $10^5$ - $10^8$  células maternas nucleadas ou 1-10 células fetais por mL de sangue materno. Para além disso, não se consegue distinguir a maioria das células fetais das células maternas apenas com base na

morfologia, pelo que métodos alternativos de identificação de células fetais têm sido investigados.

A US2007/0015171 descreve um método não-invasivo para isolamento e detecção de ADN fetal. O método enriquece uma amostra de sangue materno usando anticorpos que se ligam especificamente a células maternas e/ou anticorpos que se ligam especificamente a células fetais. Os inventores sugerem o uso de uns poucos anticorpos especificamente mencionados: Hle-1 é um anticorpo que reconhece um antigénio presente em leucócitos humanos maduros e em precursores de eritrócitos muito imaturos, mas não reconhece eritrócitos nucleados maduros. Assim, é sugerido que este anticorpo pode ser usado para reconhecer leucócitos maternos, mas não eritrócitos fetais nucleados. Finalmente, os autores sugerem o uso de um anticorpo monoclonal, que reconhece o recetor de transferrina (TfR) em células fetais. ADN de células fetais isoladas é subsequentemente disponibilizado para detecção e diagnóstico.

A WO2006119569 fornece no Exemplo 7 um método para a marcação de células fetais em células de sangue materno fixadas usando um anticorpo anti-telomerase marcado.

No entanto, permanece a necessidade de melhores métodos para isolar células fetais de amostras de sangue materno de modo a facilitar a detecção e diagnóstico pré-natais.

### **Resumo da invenção**

A invenção é definida pelas reivindicações 1-4.

Outro aspeto da divulgação relaciona-se com métodos de identificação e/ou enriquecimento de células fetais numa amostra de sangue materno usando mARNs expressados preferencialmente em células fetais e/ou proteínas codificadas pelos mARNs.

Esses métodos compreendem os passos de

- a. Fornecer uma amostra de sangue materno ou uma fração desta
- b. Fazer a amostra contactar com

- i. Uma sonda de hibridação dirigida a um ácido nucleico compreendendo pelo menos 10 pb de um gene selecionado a partir do grupo que consiste em TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e, MMP23A/MMP23B ou

- ii. um ligando dirigido a um antígeno codificado por um gene selecionado a partir do grupo que consiste em TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, LA-C, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B.

Após enriquecimento e/ou identificação, a(s) célula(s) fetal(ais) são tipicamente sujeitas a um passo de detecção, de modo a que um passo de predição e/ou diagnóstico do feto possa ser feito.

### **Divulgação**

A presente divulgação é baseada na identificação de mARNs codificadores de proteínas que são expressas preferencialmente em células fetais de uma amostra de sangue materno. Isto é, os mARNs estão presentes em níveis aumentados nas células fetais quando comparado com os níveis de mARNs nas células de sangue materno. Assim, os mARNs identificados podem ser usados para identificação de células fetais numa amostra de sangue materno por detecção ou quantificação de mARN ou da proteína codificada pelo mARN. Quando o termo detecção é aqui usado, ele inclui detecção e quantificação. No entanto, em duas formas de realização separadas, o termo detecção inclui detecção ou quantificação. Geralmente, um especialista reconhece quando é que detecção inclui também quantificação, isto é, quando é relevante quantificar os níveis de mARN ou os níveis da proteína codificada pelos mARNs. Isto pode ser necessário, por exemplo, para detecção de um determinado mARN o qual é expresso a níveis baixos nas células materna (mas não está ausente) e quando o mesmo mARN é expresso, por exemplo, a níveis 3 vezes mais elevados em células fetais.

Um subconjunto de mARNs codificam proteínas expostas à superfície, e estas proteínas podem ser usadas como antigénios para ligandos tais como aptâmeros ou anticorpos e o uso destes ligandos permite o enriquecimento e/ou identificação de células fetais numa amostra de sangue materno. Este enriquecimento é desejável porque as células fetais obtidas do sangue materno podem ser usadas para detecção e diagnóstico pré-natal.

Outra descoberta que os presentes inventores fizeram é que um passo de fixação das células da amostra materna ajuda imenso a identificação e enriquecimento das células fetais da amostra. Este passo de fixação pode ser realizado em conjunto com os métodos de enriquecimento e/ou identificação de células fetais aqui descritos ou em conjunto com métodos de enriquecimento e/ou identificação de células fetais que são descritos na técnica anterior (por exemplo, US2007/0015171 descrita na secção de antecedentes).

### **Fixação das células de uma amostra de sangue materno**

Um primeiro aspeto da divulgação é baseado na descoberta de que a fixação das células de uma amostra de sangue materno aumenta imenso a estabilidade das células fetais numa amostra de sangue materno, ao mesmo tempo que permite o enriquecimento e identificação de células fetais, por exemplo, como descrito adicionalmente no segundo aspeto da invenção. O procedimento de fixação pode ser realizado numa amostra de sangue não enriquecida imediatamente após recolha da amostra, resultando na fixação de todos os componentes celulares na amostra de sangue materno. Ao mesmo tempo, a fixação é tão ligeira que os eritrócitos maternos podem ser lisados seletivamente num passo de lise subsequente.

Portanto, um primeiro aspeto da divulgação é um método que compreende os passos de

- a. Fornecer uma amostra de sangue materno ou uma fração desta
- b. Fazer contactar a amostra com uma solução de fixação

Preferencialmente, a amostra de sangue materno contacta com a solução de fixação imediatamente após a amostra ter sido obtida. O termo imediatamente conforme usado neste contexto significa que a amostra não é sujeita a qualquer outra manipulação antes de contactar com a solução de fixação. Preferencialmente, a amostra contacta com a solução de

fixação em menos de 24 horas após a amostra ter sido obtida. Mais preferencialmente, a amostra contacta com a solução de fixação em menos de 12 horas, tal como 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 15 minutos após a amostra ter sido obtida. O mais preferido, a amostra contacta com a solução de fixação em menos de 1 hora após a amostra ter sido obtida.

Noutra forma de realização, a solução de fixação é adicionada a sangue total e preferencialmente antes de um passo opcional de sedimentação, tal como, por exemplo, sedimentação por gravidade ou sedimentação por centrifugação.

A fixação é preferencialmente realizada entre 1 e 60 minutos. Mais preferencialmente, a fixação é realizada entre 5 e 30 minutos e o mais preferido, a fixação é realizada entre 5 e 15 minutos, tal como 10 minutos.

A solução de fixação compreende preferencialmente entre 2,5% e 7,5% de paraformaldeído, mais preferencialmente entre 3% e 6%, e o mais preferido entre 4% e 5%.

Para além de paraformaldeído, a solução de fixação compreende preferencialmente sal numa concentração entre 0,05 M e 0,3 M. Mais preferencialmente, a concentração é entre 0,1 e 0,2 M e o mais preferido é uma concentração entre 0,125 e 0,175 M. O sal é preferencialmente LiCl, KCl, NaCl ou PBS, sendo PBS o mais preferido.

Quando as concentrações da solução de fixação mencionadas acima são usadas, é preferido adicionar entre 0,2 e 10 volumes da solução de fixação à amostra de sangue materno para fixação, mais preferencialmente são adicionados entre 0,5 e 5 volumes e o mais preferido são adicionados entre 1 e 3 volumes. Tipicamente, são adicionados 2 volumes. Ainda noutra forma de realização, é preferido adicionar entre 1/3 e 3/3 volumes de solução de fixação, por exemplo, 2/3 volumes.

É evidente para um especialista que as várias concentrações da solução de fixação e número de diluições podem ser ajustados de modo a originar as concentrações finais desejadas após a solução de fixação ter sido adicionada à amostra de sangue materno. Preferencialmente, a concentração final de paraformaldeído é entre 2 e 6%, mais preferencialmente entre 3 e 5% e o mais preferido entre 3,5% e 4,5%. Uma concentração final típica é 4%.

Preferencialmente, o passo de fixação é seguido de um passo de lise compreendendo:

c. Contactar a amostra fixada do passo a com um tampão de lise

- em que o tampão de lise compreende um detergente não-iónico, preferencialmente Triton X-100. Concentrações preferidas de detergente são entre 0,01% e 0,5%, mais preferencialmente entre 0,05%-0,3%, e o mais preferido 0,1%.

Numa forma de realização preferida, o passo de lise é realizado imediatamente após o passo de fixação.

Conforme mencionado acima, o passo de lise surpreendentemente permite a lise seletiva de eritrócitos maternos.

Um segundo aspeto da divulgação é o uso da solução de fixação para fixar células fetais numa amostra de sangue materno ou uma fração deste, como descrito no primeiro aspeto. Numa forma de realização preferida, a solução de fixação é para uso no método do quarto aspeto.

Um terceiro aspeto da divulgação é o uso do tampão de lise para lise seletiva de eritrócitos maternos numa amostra de sangue materno ou uma fração deste, como descrito no primeiro

aspecto. Numa forma de realização preferida, o tampão de lise é para uso no método do quarto aspecto.

### **Contactar a amostra de sangue materno com um ligando ou sonda**

Um quarto aspecto da presente divulgação fornece um método que compreende os passos de

- a. Fornecer uma amostra de sangue materno ou uma fração deste
- b. Contactar a amostra com
  - i. Uma sonda de hibridação dirigida a um ácido nucleico compreendendo pelo menos 10 pb de um gene selecionado a partir do grupo que consiste em TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, , TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B ou
  - ii. um ligando dirigido a um antígeno codificado por um gene selecionado a partir do grupo que consiste em TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3,

MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), TH2265980, TH2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614 CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B.

Os produtos genéticos dos genes estão identificados na tabela 1 assim como os níveis de expressão nas células fetais e maternas. São mostrados nos exemplos as experiências que verificam que os mARNs destes genes são preferencialmente expressos nas células fetais de uma amostra de sangue materno.

O termo “uma fração deste” é usado para indicar que a amostra de sangue materno pode contactar diretamente com um ligando ou uma sonda de hibridação ou que a amostra de sangue materno pode ser pré-processada de modo a compreender apenas uma fração da amostra original de sangue materno quando contacta com o ligando ou sonda de hibridação. A amostra de sangue materno pode, por exemplo, ser sujeita a concentração das suas células, um passo de coagulação ou um passo de enriquecimento antes de contactar com o ligando ou sonda de hibridação.

#### Sondas de hibridação

Sondas de hibridização são usadas como geralmente na técnica e são tipicamente ADN ou ARN, preferencialmente ADN. Em formas de realização preferidas, as sondas são modificadas com nucleótidos não-naturais que melhoram a afinidade de ligação e/ou especificidade de ligação. Exemplos preferidos desses nucleótidos não-naturais são LNA (ácidos nucleicos bloqueados), TINA (ácidos nucleicos torcidos intercalados), PNA (ácido nucleico peptídico), INA (ácidos nucleicos

intercalados), morfolino e monómeros de ARN 2' O-substituídos tais como monómeros de ARN 2' O-metilo e ARN 2'O(2-metoxietilo).

O comprimento das sondas é preferencialmente entre 10 e 30 nucleótidos, mais preferencialmente 15-25 nucleótidos.

#### Corantes reporter

As sondas de hibridação e ligandos para serem usados de acordo com a invenção podem compreender um corante reporter (aqui também chamado de marcador). Preferencialmente, o corante reporter é selecionado a partir do grupo que consiste em FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, VICT<sup>TM</sup>, SYBR® Green, 6 FAM, HEX, TET, TAMRA, JOE, ROX, Fluoresceína, Cy3, Cy5, Cy5.5, Vermelho do Texas, Rodamina, Rodamina verde, Rodamina Vermelha, 6-CarboxiRodamina 6G, Alexa Fluor, verde Oregon 488, verde Oregon 500 e verde Oregon 514.

Numa forma de realização, as sondas de hibridação compreendem também um corante silenciador. Numa forma de realização preferida, o corante silenciador é selecionado a partir do grupo que consiste em TAMRA<sup>TM</sup>, Black Hole Quencher<sup>TM</sup>, DABCYL, BHQ-1, BHQ-2, DDQ I, DDQ II e Eclipse Dark Quencher.

O uso de corante reporter e silenciador é desejável porque permite vários tipos de quantificações para além da identificação.

Tipicamente, o corante reporter e o corante silenciador estão localizados perto um do outro na sonda de hibridação, permitindo fluorescência induzida pela luz ou laser emitida pelo reporter a ser silenciado pelo corante silenciador. Quando o oligonucleótido se liga a uma cadeia padrão complementar, o corante reporter e o corante silenciador são separados um do outro de modo que o silenciador deixa de

silenciar o sinal do reporter, isto é, a hibridação pode ser detetada.

Portanto, numa forma de realização, a sonda de hibridação é capaz de formar uma estrutura de haste e ansa, em que o corante silenciador e reporter são colocados perto um do outro na haste. Numa forma de realização, o oligonucleótido é o chamado sinal molecular ("molecular beacon"). O silenciador e o reporter deixam de estar em proximidade quando a base do sinal molecular emparelha com uma cadeia padrão. Portanto, o sinal induzido por laser do corante reporter deixa de ser silenciado.

Em vez de usar um corante reporter e um corante silenciador, pode usar-se um par chamado FRET (transferência de energia de ressonância por fluorescência) compreendendo um fluóforo dador e um fluóforo recetor. Quando o fluóforo dador é excitado por uma fonte de luz externa, ele emite luz num comprimento de onda que excita o fluóforo recetor que, por sua vez, emite luz num comprimento de onda diferente, que pode ser detetado e medido. A energia só é transferida do dador para o recetor se o fluóforo dador e o fluóforo recetor estiverem perto um do outro.

Pares de FRET preferidos incluem BFP-YFP, CFP-YFP, GFP-DsRed, GFP-Cy3, GFP-mOrange, YFP-RFP, FAMROX, FAM-Cy5, FAM-Hex, FAM-TAMRA e Cy3-Cy5.

## Ligandos

O ligando conforme usado no método da invenção é preferencialmente um anticorpo, um péptido ou um aptâmero.

Aptâmeros são ligandos de alta afinidade à base de ácidos nucleicos que se ligam a antigénios tais como proteínas. Eles são tipicamente identificados usando técnicas de evolução *in vitro* tais como SELEX (evolução sistemática de ligandos por

enriquecimento exponencial). Em SELEX, ciclos repetidos de seleção e amplificação de ácidos nucleicos a partir de uma biblioteca inicial são usados para identificação de aptâmeros de alta afinidade. Uma vez que a biblioteca inicial é muito vasta (por exemplo,  $10^{14}$  sequências diferentes) e as sequências podem ser mutadas durante os ciclos repetidos, a identificação de aptâmeros de alta afinidade pode agora ser feita rotineiramente e esses métodos são conhecidos dos especialistas. Aptâmeros preferidos têm menos de 50 nucleótidos de comprimento.

Péptidos de alta afinidade podem ser gerados usando exibição em fagos ("phage display"). No método de "phage display", uma biblioteca de fagos exibindo péptidos é selecionada contra um alvo e subsequentemente amplificada num processo de evolução semelhante a SELEX. Existem vários sistemas de "phage display" e o tamanho do péptido pode ser escolhido para atender a necessidades específicas. Numa forma de realização, os péptidos a serem usados com o método da invenção têm um tamanho inferior a 50 aminoácidos.

Muitas vezes a biblioteca é exibida numa estrutura, por exemplo, uma estrutura de anticorpo. Assim, "phage display" pode ser usado para identificar anticorpos de alta afinidade. Outras técnicas de evolução *in vitro* para produção de anticorpos envolvem exibição em mRNA, exibição em ribossoma e exibição em ADN.

Anticorpos podem também ser gerados usando imunização de animais adequados tais como ratos, ratazanas, cabras, coelhos, cavalos, etc.

Os anticorpos usados na presente invenção podem ser monoclonais ou policlonais. Métodos para produzir ambos os tipos de anticorpos são bem conhecidos dos especialistas. Para além dos métodos de evolução *in vitro* descritos acima,

anticorpos monoclonais são tipicamente preparados usando tecnologia de hibridoma.

#### Especificidade dos ligandos

Preferencialmente, os ligandos ligam-se especificamente a células fetais. Quando se refere especificidade, entende-se que os ligandos têm uma maior afinidade de ligação para as células fetais do que para as células maternas. A afinidade de ligação pode ser expressa em termos de uma constante de dissociação (kd) e especificidade como a razão entre a kd de um dado ligando para células maternas e a kd do mesmo ligando para células fetais. Isto é, um ligando pode ter uma kd de  $10^{-5}$  M para as células maternas e  $10^{-9}$  M para células fetais. Neste caso, a especificidade seria de 10.000. No entanto, como as células fetais e maternas não são necessariamente uma população homogênea, a especificidade pode também ser expressa em termos de vezes de enriquecimento que se consegue com um determinado ligando (como descrito adicionalmente a seguir).

Numa forma de realização preferida, os ligandos são produzidos pelo método do quinto aspeto da invenção. Isto é, a especificidade dos ligandos foi otimizada.

Preferencialmente, o método compreende adicionalmente um passo de identificação de células fetais da amostra e/ou um passo de enriquecimento das células fetais da amostra. Numa forma de realização preferida, o passo de enriquecimento é realizado antes do passo de identificação.

Após enriquecimento e/ou identificação, um passo de deteção e um passo de predição e/ou diagnóstico são realizados muitas vezes.

## Identificação

Quando o método compreende um passo de identificação, uma forma de realização compreende detetar a presença do ligando ou da sonda de hibridação sobre ou dentro das células fetais.

A deteção pode ser conseguida marcando o ligando ou a sonda de hibridização com corantes fluorescentes ou outros corantes adequados para deteção. Assim, este método pode ser, por exemplo, hibridização fluorescente *in-situ* (FISH). A sonda pode compreender um silenciador assim como um fluóforo ou um par FRET como descrito acima, que permitem a deteção de sondas de hibridização ligadas às suas sequências alvo. Alternativamente ou adicionalmente, as sondas ligadas aos seus alvos são separadas das sondas não ligadas por um ou mais passos de lavagem.

A identificação pode também ser realizada usando imunomarcação usando um ligando tal como um anticorpo.

A identificação pode ser realizada usando FISH multicolorida ou imunomarcação multicolorida. Isto é, diferentes sondas de hibridação com diferentes marcadores fluorescentes podem ser usadas simultaneamente ou dois (ou mais) anticorpos diferentes com diferentes marcadores fluorescentes podem ser usados simultaneamente. Podem ser ambos específicos para células fetais ou um pode ser específico para células fetais e o outro ser específico para células maternas.

## Enriquecimento

Numa forma de realização preferida, um passo de enriquecimento dependente do ligando ou dependente da sonda de hibridação é realizado após a amostra materna ter contactado com o ligando ou a sonda de hibridação. Para

enriquecimento, um ligando é preferido em relação a uma sonda de hibridação.

Quando se refere enriquecimento, quer dizer-se que a proporção de células fetais em relação a células maternas da amostra é aumentada. A ordem de grandeza do enriquecimento é preferencialmente mais de 1000 vezes, ainda mais preferencialmente mais de 10.000 vezes e o mais preferido mais de 100.000 vezes.

Noutra forma de realização, a ordem de grandeza do enriquecimento é selecionada a partir do grupo que consiste em mais de 10 vezes, mais de 100 vezes, mais de 1000 vezes, mais de 10.000 vezes, mais de 100.000 vezes e mais de 1.000.000 vezes. A base do enriquecimento são os mARNs identificados expressos preferencialmente em células fetais e as proteínas codificadas pelos mARNs.

Uma parte dos mARNs identificados específicos das células fetais codificam antigénios expostos à superfície e numa forma de realização específica, o ligando é dirigido a um antigénio exposto à superfície da célula codificado por um gene selecionado a partir do grupo que consiste em tomoregulina, EDN1, AHNK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de Rato, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B.

O uso de ligandos dirigidos a antigénios expostos à superfície específicos de células fetais permite o enriquecimento das células fetais numa amostra materna sem permeabilizar as células (como necessário para antigénios intracelulares or ácidos nucleicos capturados por sondas de hibridação).

Como é evidente para o especialista na técnica, podem ser realizados passos adicionais de enriquecimento dependentes do antigénio com base nos ligandos (ou antigénios) conhecidos da técnica anterior. Exemplos desses antigénios conhecidos da técnica anterior são: CD34, Tra, Oct1, Crypto1 e SSEA1.

#### Separação com base no fluxo

Numa forma de realização preferida, o enriquecimento é feito usando separação de células ativada por fluorescência (FACS). Deste modo, o ligando é marcado fluorescentemente o que permite a FACS. FACS e marcadores adequados são bem conhecidos do especialista na técnica e exemplos foram dados acima.

Como alternativa à FACS, um dispositivo de microfluidos de separação de células pode ser usado.

#### Imobilização

Noutra forma de realização, o enriquecimento é feito usando imobilização dos ligandos. Os ligandos podem, por exemplo, ser imobilizados em esferas tais como esferas magnéticas, esferas de Sepharose, esferas de agarose, etc. Quando os ligandos e as células que lhe estão ligadas são imobilizados, as células não ligadas podem ser lavadas em relação às esferas. Esse processo de lavagem pode ser realizado por lotes ou em coluna. Após enriquecimento (fracionamento), as células ligadas podem ser eluídas usando sal elevado ou baixo, ligantes cliváveis, pH baixo ou alto, agentes desnaturantes, etc. Mais preferencialmente, as células ligadas são eluídas usando eluição competitiva com antigénios solúveis ou ligandos secundários que se ligam aos ligandos específicos das células fetais, por exemplo, anticorpos dirigidos à parte fixa do ligando usado para imobilização.

Um método preferido de enriquecimento é MACS (separação de células imunomagnética), em que os ligandos são imobilizados em esferas magnéticas. Isto é, as células ligadas aos ligandos podem ser separadas das não-ligadas seleccionando as partículas usando magnetismo.

#### Seleção negativa usando antigénios

Ligandos que se ligam especificamente às células maternas podem também ser usados para enriquecimento. Portanto, numa forma de realização preferida, o método compreende ainda um passo de contactar a amostra com um ligando específico das células maternas dirigido a um antigénio materno. Após contactar a amostra com um ligando específico de células maternas, o enriquecimento pode ser feito usando, por exemplo, FACS, MACS, microfluidos ou imobilização como descrito acima.

Preferencialmente, o ligando é seleccionado a partir do grupo que consiste em ligandos que se ligam a antigénios codificados por mARNs preferencialmente expressos nas células de sangue materno como identificado pelos presentes inventores.

Como é evidente para o especialista na técnica, podem ser usados passos adicionais de enriquecimento dependentes do antigénio (seleções negativas) com base em ligandos (ou antigénios) conhecidos da técnica anterior. Assim, numa forma de realização, é realizado um passo adicional de enriquecimento dependente de antigénio, em que o ligando é seleccionado a partir do grupo que consiste em ligandos que se ligam a antigénios específicos maternos conhecidos da técnica anterior tal como CD45, HLA-A, HLA-B ou anticorps seleccionados a partir do grupo que consiste em HLe-1, M3 e L4.

Um marcador de tipo de células preferido para seleção negativa é CD45 também conhecido como antigénio leucocitário comum. O CD45 é uma proteína transmembranar expressa por todas as células hematopoiéticas diferenciadas exceto eritrócitos e células plasmáticas. A proteína CD45 existe em diferentes formas que são todas produzidas a partir de um único gene complexo originando oito mARNs diferentes maduros e resultando em oito diferentes produtos proteicos. É expresso em todos os leucócitos mas não em outras células, e portanto funciona como um marcador pan-leucocitário incluindo os tipos diferentes e diversos de leucócitos (ou glóbulos brancos) tais como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos (células B e T), monócitos e macrófagos.

Devido à expressão de CD45 numa grande maioria das células nucleadas presentes no sangue materno, uma seleção negativa usando o marcador CD45 é preferida. Após depleção de células CD45 positivas, as células CD45 negativas da amostra são recolhidas. Essa depleção e recolha pode ser realizada por qualquer método adequado conhecido na técnica.

#### *HLA*

Os antigénios de leucócitos humanos, parte do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) humano são responsáveis por proteínas apresentadoras de antigénios à superfície da célula e muitos outros genes.

Duas classes de antigénios de leucócitos humanos estão presentes, antigénios de classe I (A, B & C) e antigénios de classe II (DR, DP, & DQ) as quais têm diferentes funções. Ambas as classes incluem um elevado número de alelos variáveis. Genes HLA não expressados pelas células fetais podem ser usados para depleção das células maternas na amostra.

### *Outros métodos de enriquecimento*

Métodos de enriquecimento adicionais que não usam ligandos específicos de antigénios podem também ser usados.

Um método adicional preferido de enriquecimento é a lise de eritrócitos tal como a lise mediada por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , que permite a lise seletiva dos eritrócitos deixando as células nucleadas intactas. Este método é conhecido do especialista na técnica. Para a lise mediada por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  preferencialmente uma concentração de 0,1-0,2 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é usada, tal como 0,14-0,18 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mais preferencialmente mM 0,15-0,17 de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Os métodos de fixação e lise seletiva descritos no primeiro aspeto podem também ser usados para enriquecimento.

A amostra pode também ser sujeita a separação inicial com base no tamanho ou densidade, tal como por centrifugação por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. Isto resulta na produção de uma camada sobrenadante, que contém plaquetas; uma camada de células mononucleares; e um precipitado aglutinado que contém eritrócitos não nucleados e granulócitos. A camada mononuclear é separada das outras camadas para produzir uma amostra materna enriquecida em células fetais.

Propriedades físicas das células, tal como a carga, mas não exclusivamente, podem também ser utilizadas para enriquecimento.

### *Combinar ligandos e métodos de enriquecimento*

Como se vai perceber, os vários ligandos e métodos de enriquecimento podem ser combinados. Assim, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais ligandos específicos de células fetais podem ser

usados ao mesmo tempo ou em sucessão. Do mesmo modo, podem ser usados enriquecimentos repetidos usando respetivamente ligandos específicos de células fetais e ligandos específicos de células maternas.

#### A amostra

É desejável obter uma amostra de sangue materno o maior possível de modo a aumentar o número total de células fetais. No entanto, devido a problemas práticos, a amostra tem de estar entre determinados limites. Do mesmo modo, o tamanho da amostra de sangue materno está preferencialmente na gama de 0,5 até 50 mL, tal como na gama de 1 até 40 mL, tal como desde 5 até 35 mL ou 10 até 30 mL.

A amostra de sangue materno fornecida é preferencialmente obtida de uma mulher grávida entre 5 -24 ou 6 -20 semanas de gestação, mais preferencialmente entre 7-16, ou 8-12 semanas de gestação.

#### *Diluição - concentração*

Também, de acordo com a invenção a amostra pode ser diluída ou concentrada em qualquer altura durante o método de enriquecimento ou identificação de uma célula fetal (para facilitar a identificação das células fetais e em conexão com a viabilidade dos diferentes passos do método). A amostra pode ser diluída pelo menos 1,5 vezes, tal como duas vezes, mais preferido pelo menos três vezes, tal como cinco vezes adicionando tampões isotónicos, tal como soluções salinas, soluções salinas tamponadas com fosfato, PBS, e/ou meios de crescimento adequados, tal como meios basais, e meios de crescimento de tecidos. Um passo do método pode incluir a diluição de uma amostra por adição de vários componentes atribuídos ao passo do método específico.

Para realizar o método, pode ser vantajoso, para a viabilidade dos diferentes passos do método, concentrar a amostra, por exemplo, reduzir o volume sem remover quaisquer células. O volume da amostra pode ser reduzido para menos de 80%, tal como 70, ou 60 ou 50% do volume da amostra original, ou mesmo preferencialmente até menos de 40%, tal como 25% do volume da amostra original. Um passo de concentração pode ser centrifugação. O método de acordo com a invenção compreende um ou mais passos de concentração. Centrifugação é um método preferido para concentrar as células. De modo a evitar danos nas células é preferida uma centrifugação ligeira, tal como 300 g durante 10 minutos.

#### *Sedimentação*

As células presentes na amostra de sangue podem ser concentradas por sedimentação em vez de centrifugação, em que a maioria das células presentes na amostra é deixada sedimentar. A amostra de sangue pode ser diluída antes da sedimentação numa solução adequada, tal como 0,15 M de NaCl. A sedimentação pode continuar até a sedimentação total ter ocorrido, tal como durante pelo menos 5 horas, ou preferencialmente durante a noite.

Preferencialmente, a amostra é deixada a sedimentar a uma temperatura abaixo da temperatura ambiente, tal como a uma temperatura inferior a 15°C, tal como inferior a 10°C ou 8°C ou 6°C, preferencialmente a uma temperatura de 2-8°C ou cerca de 4°C.

Uma pequena população de células com baixa densidade pode não sedimentar e pode ser isolada por pré-fixação ligeira como descrito a seguir, tal como em 0,5% de paraformaldeído seguido de centrifugação.

### *Fixação*

Numa forma de realização preferida do quarto aspeto da invenção, as células da amostra de sangue materno são fixadas como descrito no primeiro aspeto da invenção. Assim, numa forma de realização preferida, os eritrócitos maternos são seletivamente lisados imediatamente após a fixação.

### *Deteção e diagnóstico*

Preferencialmente, o método da invenção é usado para deteção pré-natal e predição e/ou diagnóstico. Portanto, uma célula identificada pode ser sujeita a deteção e predição e/ou diagnóstico ou uma amostra de sangue materno enriquecida para células fetais pode ser sujeita a deteção e predição e/ou diagnóstico.

Numa forma de realização, proteínas fetais são disponibilizadas para deteção, por exemplo, por via de immunoblotting, sequenciação de proteínas ou espetrometria de massa.

Noutra forma de realização preferida, deteção e/ou diagnóstico compreendem um passo de disponibilizar ADN ou ARN fetal para deteção.

Métodos de deteção preferidos são FISH (hibridização fluorescente *in-situ*), northern blotting, southern blotting, sequenciação de ADN/ARN, análise de microarray e amplificação. Esses métodos podem ser usados para detetar a presença de sequências específicas que indicam uma determinada condição, por exemplo, uma doença pré-natal ou predisposição para uma determinada doença. Os métodos podem também ser usados para detetar uma aneuploidia cromossómica tal como trissomia 13, trissomia 18 ou trissomia 21. Os

métodos de detecção podem também ser usados para determinar o género do feto pela detecção de sequências específicas de Y.

Numa forma de realização alternativa, o número de células fetais na amostra é comparado com um número padrão. Números elevados de células fetais na amostra podem indicar que a gravidez é de risco. O número de células fetais na amostra (assim como na amostra de controlo) pode ser estimado usando, por exemplo, FACS.

#### Identificação de ligandos específicos

Um quinto aspeto da divulgação é um método para identificar um ligando específico de células fetais compreendendo os passos de:

- a) Fornecer uma biblioteca de ligandos candidatos específicos de células fetais
- b) Fornecer um conjunto de células maternas
- c) Fazer contactar a biblioteca do passo a com as células maternas do passo b
- d) Selecionar ligandos que não se ligam às células maternas para gerar uma biblioteca esgotada de ligandos que se ligam às células maternas

Numa forma de realização preferida, o método compreende ainda os passos de

- e) Fazer contactar a biblioteca do passo a ou a biblioteca do passo d com uma célula fetal
- f) Selecionar ligandos que se ligam às células fetais para produzir uma biblioteca que é enriquecida em ligandos que se ligam às células fetais, mas não às células maternas

Deve ser esclarecido que uma célula é suficiente para seleccionar os ligandos do passo f, mas mais células fetais podem ser obviamente usadas.

Os passos b-f podem ser realizados pelos passo de

- g) Fornecer uma amostra de sangue materno
- h) Fazer contactar uma biblioteca com uma amostra de sangue materno
- i) Selecionar ligandos que se ligam às células fetais removendo células fetais individuais, que foram identificadas por demonstração FISH de um cromossoma Y, e recolhendo os ligandos somente destas células.

A amostra de sangue materno podem ter sido enriquecida para células fetais.

Numa forma de realização preferida, o método compreende ainda:

- j) multiplicar/amplificar os ligandos selecionados tal como preparar uma biblioteca amplificada para seleções adicionais contra células fetais e/ou contra células maternas.

Como será evidente, várias repetições de seleção e amplificação podem ser realizadas para identificar os melhores ligandos.

A biblioteca de ligandos candidatos específicos para células fetais pode ser uma biblioteca de anticorpos ou péptidos exibidos em fagos ("phage display"), mARN (exibição em ribossomas ou exibição em mARN) ou em ADN (exibição covalente ou "panning" de plasmídeos). A biblioteca pode também ser uma biblioteca de oligonucleótidos de ADN ou ARN para a identificação de aptâmeros.

O termo "candidatos" é usado para significar que os compostos da biblioteca não se ligam necessariamente às células fetais. Eles são testados para a identificação de ligandos específicos de células fetais.

Numa forma de realização, a biblioteca de ligandos candidatos específicos de células fetais é uma biblioteca completamente aleatória. Nesse caso, a biblioteca pode primeiro ser repetidamente selecionada contra células fetais e amplificada, antes da contra-seleção (seleção negativa) contra células maternas ser realizada.

Noutra forma de realização, a biblioteca de ligandos candidatos específicos de células fetais é baseada em ligandos conhecidos de células fetais. Essa biblioteca pode, por exemplo, ser criada exibindo um anticorpo que se liga a células fetais num fago e mutagénese do gene que codifica o anticorpo para criar uma biblioteca. Nesse caso, a mutagénese pode melhorar a especificidade ao mesmo tempo que retém ou melhora a afinidade pelas células fetais.

Numa forma de realização, o ligando liga-se a uma antigénio codificado por um gene selecionado a partir do grupo que consiste em tomoregulina, EDN1, AHNAK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de Rato, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6/CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B. Assim, a afinidade e/ou especificidade do ligando são otimizadas usando o método descrito acima.

Ligandos específicos de células fetais e sondas de hibridização

Um sexto aspeto da divulgação é

- i. um ligando que se liga a um antigénio codificado por um gene selecionado a partir do grupo que consiste em TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNAK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196,

FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLAC, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B

- ii. ou uma sonda de hibridização dirigida a um ácido nucleico que compreende pelo menos 10 bp de um gene selecionado a partir do grupo que consiste em TMEFF2, ABHD2, ACVR2B, ADAM11, AHNK, AK000420, ALS2CL, BC089454, BC111482, CB123670, CCNA2, CD7, CPS1, CRYL1, D4ST1, DKFZp434F142, EDN1, EEF1A1, ENST00000356196, FLJ35740, FYN, GCC2, GSK3A, HIST1H2AJ, HLA-C, HMGA1, HMGN2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGP2, RP11-78J21.1, RPL23, RPL23A, RPL26, RPL39, RPS27, SLAMF1, SYT9, T (BRACHYURY), THC2265980, THC2274391, TP73, TPM3, UBL4A, WRN, ZFYVE9, ZNF283, ZNF539, ZNF614, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B.

Mais preferencialmente, o ligando é um ligando que se liga a um antígeno codificado por um gene selecionado a partir do grupo que consiste em tomoregulina, EDN1, AHNK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de Rato, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5, KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 MMP23A/MMP23B, isto é, antígenos expostos à superfície. Preferencialmente, a kd do ligando para o

antigénio escolhido é inferior a  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  e  $10^{-10}$  M. A  $K_d$  do ligando para quaisquer antigénios presentes nas células de sangue materno é preferencialmente pelo menos 100 vezes mais elevada e ainda mais preferencialmente mais 1000 ou 10.000 vezes mais elevada.

[0104] Numa forma de realização, o ligando é característico na medida em que permite 90% de seleção correta das células numa amostra de teste compreendendo 99,9% de células maternas e 0,1 % de células fetais. Isto é, quando se refere a 90 % de identificação correta, o que significa é que quando se realiza a seleção com a amostra de teste e com o ligando, 90 células fetais serão recolhidas para cada 10 das células maternas e do mesmo modo para melhor/pior correção. Um método de seleção preferido é MACS. Mais preferido é um ligando que permite 95% de seleção correta, 98% de seleção correta ou ainda mais preferido 99% de seleção de células correta. Uma vez que uma amostra de sangue materno tem uma abundância de células fetais muito baixa, é ainda mais preferido que o ligando permita a seleção correta de 99,9%, 99,99% ou 99,999% de células a partir de uma amostra de teste como descrito acima.

Preferencialmente, os ligandos do seis aspetos são aptâmeros, péptidos ou anticorpos como descrito no quarto e quinto aspetos. O mais preferido são anticorpos.

Os ligandos são preferencialmente identificados usando o método do quinto aspeto de modo a terem uma especificidade melhorada.

Um sétimo aspeto da divulgação é o uso de ligandos ou sondas de hibridização do sexto aspeto para enriquecer uma amostra de sangue materno em relação a células fetais ou para identificar as células fetais numa amostra de sangue materno. Preferencialmente, o uso de ligandos ou sondas de hibridização é como descrito no quarto aspeto da invenção.

Um oitavo aspeto da divulgação é um kit compreendendo um ligando ou uma sonda de hibridação como descrito no sexto aspeto da divulgação e instruções de uso.

O kit compreende um primeiro ligando para enriquecimento e um segundo ligando e/ou uma sonda de hibridização para identificação.

Numa forma de realização preferida, o kit compreende também um tampão de fixação e um tampão de lise como descrito no primeiro aspeto da divulgação

Os seguintes Exemplos 1 e 3 são Exemplos da invenção e os Exemplos 2,4-5 são Exemplos de referência, que não fazem parte da invenção.

### **Exemplos**

O Exemplo 1 é escrito no presente porque descreve passos metódicos a serem realizados no enriquecimento e/ou identificação de células fetais a partir de uma amostra de sangue materno usando os métodos da invenção. A síntese de cADN e microarranjos normalmente não é necessária para enriquecimento e/identificação, mas pode ser usada em algumas situações. Deve esclarecer-se que os passos descritos no exemplo 1 foram de facto realizados para a identificação de mARNs expressos preferencialmente em células fetais de uma amostra de sangue materno.

#### **Exemplo 1**

Identificação de mARNs expressos preferencialmente em células fetais de uma amostra de sangue materno.

Fixação, lise e permeabilização do sangue materno.

Amostras de sangue periférico de 10 até 30 mL são obtidas a partir de mulheres grávidas de 11 a 14 semanas de tempo de gestação. As amostras de sangue são recolhidas antes de um procedimento invasivo e após consentimento informado. Todas as amostras de sangue são recolhidas em tubos heparinizados e processadas imediatamente após terem sido recolhidas.

Para além de sangue com heparina, 5 mL de sangue são extraídos em tubos de EDTA. Este sangue é usado para a análise do género do feto. O género do feto é estabelecido analisando o ADN fetal livre.

Para cada amostra 3 mL de sangue total são divididos em alíquotas em tubos de centrifugação de 50 mL pré-revestidos (3 a 10 tubos de 50 mL por amostra) usando pipetas pré-revestidas (o tampão de pré-revestimento é BSA a 2% em PBS a/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Dois mL de formaldeído a 10% em PBS são adicionados a cada tubo usando pipetas pré-revestidas. Após mistura cuidadosa as células sanguíneas são fixadas durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Após fixação 30 mL de Triton X-100 a 0,12% em PBS (a/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) são adicionados a cada tubo. Os tubos são invertidos 3 vezes, e as células vermelhas do sangue são lisadas durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após a lise, 15 mL de BSA a 2%, frio (4°C), em PBS (a/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) são adicionados a cada tubo. Após mistura por inversão dos tubos 2 vezes, as células não lisadas são sedimentadas por centrifugação a 500 g durante 15 minutos a 40 C. Após a remoção do sobrenadante, as células são ressuspensas em 10 mL de PBS frio 40 C a/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , e as amostras são armazenadas a 4° C durante a noite.

Apenas as amostras de sangue de mulheres grávidas com um feto do sexo masculino são analisadas adicionalmente. Estas amostras são permeabilizadas adicionando 10 mL de metanol frio (- 20° C) aos 10 mL da suspensão de células armazenadas

durante a noite, e as células são permeabilizadas durante 10 minutos a 4° C. Após centrifugação a 500 g durante 10 minutos, os sedimentos de células são combinados num tubo usando pipetas pré-revestidas. Os tubos vazios são enxaguados com 1 mL de PBS, BSA a 0,5%, EDTA 2 mM. As células reunidas são então transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas a 500 g durante 10 minutos e ressuspensas de modo a corresponder a 40 µL de PBS contendo BSA a 0,5% e EDTA 2 mM por 1 mL de sangue total, e as células são espalhadas sobre lâminas revestidas com polilisina (4 mL cada). Um total de 60 lâminas são feitas a partir de cada amostra de sangue masculino. Após secagem ao ar as lâminas são seladas individualmente em sacos de plástico hermeticamente fechados e armazenadas a -20° C até nova análise.

A identificação das células fetais masculinas por FISH de cor reversa e varredura automática. As lâminas são recuperadas do congelador e os sacos de plástico hermeticamente fechados são removidos. Antes da hibridização, as lâminas são lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e durante 5 minutos antes de serem desidratadas 3 minutos cada em etanol a 60%, 80% e 99,9% e secas ao ar.

Sondas de repetição específica do cromossoma, marcadas com DXZ1 com espectro verde e marcadas com DYZ1 com espectro laranja (Abbott Molecular) são usadas para a primeira hibridização. A mistura de hibridização contendo ambas as sondas é preparada misturando 1 parte da sonda X, 1 parte da sonda Y, 1 parte de água destilada, e 7 partes de tampão de hibridização (Vysis). Para o FISH de todas as lâminas, 28 µL da mistura de hibridização são adicionados e cobertas por lamelas 22 x 50mm. As lamelas são seladas com cola de borracha e os ADN são desnaturados numa placa aquecida a 83,5 °C durante 7 minutos e hibridizadas durante a noite numa atmosfera humidificada a 42 °C.

No dia seguinte as lâminas hibridizadas são lavadas durante 2 minutos em 0,4 x SSC/Tween 20 0,3% a 73 °C e durante 1 minuto em 2 x SSC/Tween 20 0,1% à temperatura ambiente. As lâminas são depois montadas em Vectashield com 1,5 mg/mL de DAPI como contra coloração.

As células contendo um sinal vermelho localizado num núcleo corado com DAPI são identificadas por varredura automática usando dois tipos diferentes de scanners. O sistema de varredura de lâminas MDS (versão 5.8.0) originalmente desenvolvido por Applied Imaging, e o sistema de varredura MetaCyte desenvolvido por MetaSystems. Com o sistema de varredura MDS as lâminas são analisadas com um aumento de 20x usando função de varredura 5. Com o MetaCyte as lâminas são varridas com um aumento de 10x usando um classificador otimizado internamente para detetar os verdadeiro sinais FISH do Espetro Laranja. Após varredura, as células identificadas pelo leitor são inspecionadas visualmente por relocalização automática. As células que têm um sinal vermelho mas dois sinais X verdes são descartadas, enquanto que as células que têm um sinal vermelho e um sinal X verde ou um sinal X verde dividido são classificadas como células fetais masculinas candidatas.

A verdadeira origem fetal das células fetais candidatas é analisada por rehibridização das células candidatas com as mesmas sondas X e Y em cores invertidas. Primeiro, as lamelas são removidas por incubação das lâminas em 4xSSC/Tween 20 0,1% durante 10 minutos. As lâminas são depois lavadas em 2xSSC durante 5 minutos, desidratadas por etanol 60%, 80%, e 99,9% e secas ao ar. A mistura de hibridização contendo 1 parte das sondas de repetição específicas de cromossoma, DXZ1 marcado com espectro vermelho, 1 parte da sonda de repetição específica de cromossoma marcada com DYZ1 de espectro verde, 1 parte de água destilada, e 7 partes de tampão de hibridização é usada para re-hibridação. Para todas as lâminas de FISH, são adicionados 28 µL da mistura de hibridização e cobertas

com lamelas 22 x 50 mm. Para FISH seletivo, 2,5 mL da mistura de hibridização são aplicados em posições nas lâminas onde as células fetais candidatas tinham sido encontradas e a mistura é espalhada cobrindo com uma lamela circular de 10mm. As lamelas são depois seladas com cola de borracha, e os ADNs são denaturados numa placa aquecida a 83,5 °C durante 7 minutos e hibridizadas durante a noite numa atmosfera humidificada a 42 °C.

Após a re-hibridização as lâminas são lavadas durante 2 minutos em 0,4 x SSC/Tween 20 0,3 % a 73 °C e durante 1 minuto em 2 x SSC/Tween 20 0,1% à temperatura ambiente. As lâminas são depois montadas em Vectashield contendo DAPI.

As lâminas re-hibridizadas são colocadas num microscópio de varrimento e células fetais candidatas re-hibridizadas são relocalizadas e os sinais de FISH são analisados visualmente. As células fetais candidatas re-hibridizadas onde o sinal vermelho permanece vermelho e o sinal verde mudou para vermelho são classificadas como células fetais falsas (< 5%), enquanto as células fetais candidatas re-hibridizadas onde o sinal vermelho mudou para verde e o sinal verde para vermelho são classificadas como células fetais verdadeiras (> 95%).

#### PALM

Quando foram detetadas 23 células fetais por re-hibridização, as posições exatas (coordenadas) das células fetais individuais nas lâminas do microscópio são determinados usando um Englandfinder, de modo a que as células fetais possam ser reencontradas em outros microscópios.

As células fetais são disparadas nas lâminas do microscópio usando uma tecnologia de Microdisseção a Laser e Pressure Catapultagem de Pressão (LMPC) num sistema de microscópio PALM MicroBeam da Carl Zeiss. As lâminas de microscópio contendo células fetais são transportadas para a Carl Zeiss

MicroImaging GmbH, (localizada em Munique, Alemanha), onde as células fetais são re-encontradas usando as suas coordenadas específicas no Englandfinder. As lamelas são removidas cuidadosamente após imersão das lâminas em PBS durante 10-15 minutos. As lâminas são depois lavadas durante 10 minutos em PBS antes de serem desidratadas 3 minutos cada em etanol 60%, 80% e 99,9% e secas ao ar. As células fetais são depois disparadas na lâmina para uma tampa adesiva de um tubo dimensionado para PCR por catapulta a laser usando um microscópio PALM MicroBeam. Todas as 23 células fetais são colhidas na mesma tampa. Numa outra tampa as células de controlo maternas são colhidas: A partir de cada lâmina contendo uma célula fetal, 100 das células maternas circundantes são colhidas na tampa de controlo, dando um número total de 2300 células de controlo maternas. Os dois tubos contendo células fetais e células controlo nas suas tampas, respetivamente, são enviados para Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemanha, para análise posterior.

O ARN da amostra fetal e amostra controlo é amplificado por Miltenyi Biotec pelo seu SuperAmp Service conforme descrito na sua homepage. O cADN amplificado é usado para fazer dois tipos diferentes de Microarranjos: Agilent Whole Genome Microarray e o PIQOR™ Stem Cell Microarray, como descrito na homepage da Miltenyi Biotec.

A partir dos resultados do microarranjo, 61 genes (listados na tabela 1) são primeiro selecionados como candidatos prováveis a marcadores de células fetais. Eles são seleccionados com base em três critérios diferentes: 41 genes são selecionados porque têm 2 ou mais sondas diferentes no arranjo mostrando fortes sinais em todo o arranjo do genoma fetal Agilent e nenhum sinal ou sinal muito fraco em todo o arranjo do genoma materno Agilent. 10 genes são selecionados devido aos sinais muito fortes em todo o arranjo do genoma fetal Agilent.

Os últimos 10 genes são selecionados porque ambos os arranjos do genoma completo Agilent e o PIQOR™ Stem Cell Microarray mostram sinais no arranjo fetal (Agilent) / canal (PIQOR™ Stem Cell Microarray), mas não no arranjo/canal materno. Os 61 genes são estudados minuciosamente na literatura e nesta base, 9 genes são selecionados como marcadores candidatos de células fetais expostos à superfície das células: EDN1, AHNAK, tomoregulina, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, Mouse T, ACVR2B.

Tabela 1

| Nome do gene | Nome sistemático | Descrição                                                                                                                                                        | Sinal maternal | Sinal fetal |
|--------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------|
| ZNF614       | NM_025040        | proteína 614 dedo de zinco de Homo sapiens (ZNF614), mARN [NM_025040]                                                                                            | 2,50           | 52,61       |
| ZNF539       | NM_203282        | proteína 539 dedo de zinco de Homo sapiens (ZNF539), mARN [NM_203282]                                                                                            | 1,66           | 20,81       |
| ZNF283       | AK098175         | cADN de Homo sapiens FLJ40856 fis, clone TRACH2016498, moderadamente semelhante a PROTEÍNA 184 DEDO DE ZINCO. [AK098175]                                         | 1,21           | 773,52      |
| ZFYVE9       | NM_004799        | dedo de zinco de Homo sapiens, domínio FYVE contendo 9 (ZFYVE9), variante transcrita 3, mARN [NM_004799]                                                         | 1,86           | 785,02      |
| WRN          | NM_000553        | síndrome de Werner (WRN) de Homo sapiens, mARN [NM_000553]                                                                                                       | 0,86           | 13,39       |
| UBL4A        | NM_014235        | Ubiquitina tipo 4A de Homo sapiens (UBL4A), mARN [NM_014235]                                                                                                     | 0,87           | 80,27       |
| TPM3         | NM_153649        | tropomyosin 3 de Homo sapiens (TPM3), variante transcrito                                                                                                        | 1,03           | 25,86       |
| TP73         | NM_005427        | tumor proteína p73 de Homo sapiens (TP73), mARN [NM_005427]                                                                                                      | 0,89           | 14,53       |
| TMEFF2       | AB004064         | mARN de Homo sapiens for tomoregulina, complete cds. [AB004064]                                                                                                  | 2,73           | 899,23      |
| THC227439    | THC2274391       | RIFK_HUMAN (Q969G6) Riboflavina quinase (ATP:Riboflavina 5'-fosfotransferase) (Flavokinase), complete [THC2274391]                                               | 0,87           | 893,63      |
| THC226598    | THC2265980       | T97996 ye56c04.s1 Soares fetal liver spleen 1NFLS Homo sapiens cADN clone IMAGE: 121734 3' similar to SP:RL2B_RAT P29316 60S RIBOSOMAL PROTEÍNA ;, mARN sequence | 0,92           | 62,58       |
| T (BRACHYU   | NM_003181        | Homo sapiens T, brachyury homolog (rato) (T), mARN [NM_003181]                                                                                                   | 5,38           | 44,45       |
| SYT9         | NM_175733        | sinaptotagmina IX de Homo sapiens (SYT9), mARN [NM_175733]                                                                                                       | 0,89           | 1567,50     |
| SLAMF1       | NM_003037        | Homo sapiens signaling lymphocytic activation molecule family member 1 (SLAMF1), mARN [NM_003037]                                                                | 1,05           | 62,58       |
| RPS27        | NM_001030        | Homo sapiens ribosomal proteína S27 (metalloproteinase 1) (RPS27), mARN                                                                                          | 0,90           | 639,19      |
| RPL39        | NM_001000        | Homo sapiens ribosomal proteína L39 (RPL39), mARN [NM_001000]                                                                                                    | 0,87           | 869,05      |
| RPL26        | NM_000987        | Homo sapiens ribosomal proteína L26 (RPL26), mARN [NM_000987]                                                                                                    | 0,92           | 313,51      |
| RPL23A       | NM_000984        | Homo sapiens ribosomal proteína L23a (RPL23A), mARN [NM_000984]                                                                                                  | 0,91           | 25,80       |
| RPL23        | NM_000978        | Homo sapiens ribosomal proteína L23 (RPL23), mARN [NM_000978]                                                                                                    | 2,28           | 943,60      |

(continuação)

| Nome do gene | Nome sistemático | Descrição                                                                                                                           | Sinal materno | Sinal fetal |
|--------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|
| RP11-78J21.1 | NM_001011724     | Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoproteína A1-like (LOC144983), variante transcrito 1, mARN [NM_001011724]               | 0,89          | 52,05       |
| RGPD2        | NM_001024457     | Homo sapiens RANBP2-like and GRIP domain contendo 2 (RGPD2), mARN [NM_001024457]                                                    | 2,19          | 715,07      |
| QPRT         | NM_014298        | Homo sapiens quinolate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating)) (QPRT), mARN [NM_014298] | 1,95          | 214,40      |
| PPIA         | NM_203430        | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA), variante transcrito 2, mARN [NM_203430]                             | 0,88          | 230,29      |
| PGK1         | NM_000291        | Homo sapiens phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), mARN [NM_000291]                                                                     | 0,93          | 22,71       |
| PF4          | NM_002619        | Homo sapiens platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4) (PF4), mARN [NM_002619]                                           | 0,97          | 8,48        |
| NTRK1        | NM_002529        | Homo sapiens neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 (NTRK1), variante transcrito 2, mARN [NM_002529]                        | 2,77          | 10,84       |
| NBR2         | NM_005821        | Homo sapiens neighbor of BRCA1 gene 2 (NBR2), mARN [NM_005821]                                                                      | 0,99          | 247,30      |
| MYL6         | NM_079423        | Homo sapiens myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle (MYL6), variante transcrito 2, mARN [NM_079423]      | 2,19          | 4314,15     |
| MAPK3        | NM_002746        | Homo sapiens mitogen-activated proteína quinase 3 (MAPK3), variante transcrito 1, mARN                                              | 1,22          | 10,99       |
| MAD2L1       | NM_002358        | Homo sapiens MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) (MAD2L1), mARN [NM_002358]                                                | 0,96          | 9,16        |
| LOC389286    | NM_001018022     | Homo sapiens similar to FKSG62 (LOC389286), mARN [NM_001018022]                                                                     | 0,89          | 378,70      |
| KY           | NM_178554        | Homo sapiens kyphoscoliosis peptidase (KY), mARN [NM_178554]                                                                        | 0,95          | 868,36      |
| KMO          | NM_003679        | Homo sapiens kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase) (KMO), mARN [NM_003679]                                          | 0,88          | 163,00      |
| KCNK4        | NM_033310        | Homo sapiens potassium channel, subfamily K, member 4 (KCNK4), mARN [NM_033310]                                                     | 12,21         | 204,06      |

(continuação)

| Nome do gene    | Nome sistemático | Descrição                                                                                                                               | Sinal materno | Sinal fetal |
|-----------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|
| ITGA7           | NM_002206        | Homo sapiens integrina, alpha 7 (ITGA7), mARN [NM_002206]                                                                               | 0,92          | 10,02       |
| HMG2            | NM_005517        | Homo sapiens high-mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMG2), mARN [NM_005517]                                                  | 2,16          | 22,05       |
| HMGA1           | NM_002131        | Homo sapiens high mobility group AT-hook 1 (HMGA1), variante transcrito 2, mARN [NM_002131]                                             | 1,81          | 74,66       |
| HLA-C           | BC002463         | Homo sapiens complexo maior de histocompatibilidade , classe I, C, mARN (cADN clone MGC:2285 IMAGE:3345005), completo cds. [BC002463]   | 0,98          | 40,27       |
| HIST1H2AJ       | NM_021066        | Homo sapiens histona 1, H2aj (HIST1H2AJ), mARN [NM_021066]                                                                              | 2,97          | 49,45       |
| GSK3A           | NM_019884        | Homo sapiens glicogênio sintase quinase 3 alfa (GSK3A), mARN [NM_019884]                                                                | 2,81          | 1780,97     |
| GCC2            | NM_181453        | Homo sapiens GRIP e domínio espiral enrolada contendo 2 (GCC2), variante transcrito 1, mARN [NM_181453]                                 | 2,80          | 831,61      |
| FYN             | NM_002037        | Homo sapiens FYN oncogene relacionado com SRC, FGR, YES (FYN), variante transcrito 1, mARN [NM_002037]                                  | 0,90          | 28,36       |
| FLJ35740        | NM_147195        | Homo sapiens FU35740 proteína (FLJ35740), mARN [NM_147195]                                                                              | 0,99          | 15,22       |
| ENST00000356196 | ENST00000356196  | PREDICTED: Homo sapiens similar a 60S proteína ribossomal L26 (proteína gene 20 Silica-induzido) (SIG-20) (LOC400055), mARN [XM_374987] | 2,23          | 940,84      |
| EEF1A1          | NM_001402        | Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1), mARN [NM_001402]                                              | 1,29          | 160,32      |
| EDN1            | NM_001955        | Homo sapiens endotelina 1 (EDN1), mARN [NM_001955]                                                                                      | 0,89          | 404,58      |
| DKFZp434F142    | AL136837         | Homo sapiens mARN; cADN DKFZp434F142 (do clone DKFZp434F142). [AL136837]                                                                | 2,53          | 310,56      |
| D4ST1           | NM_130468        | Homo sapiens dermatan 4 sulfotransferase 1 (D4ST1), mARN [NM_130468]                                                                    | 1,79          | 25,13       |
| CRYL1           | NM_015974        | Homo sapiens cristalina, lambda 1 (CRYL1), mARN [NM_015974]                                                                             | 1,93          | 15,35       |
| CPS1            | NM_001875        | Homo sapiens carbamoyl-fosfato sintetase 1, mitocondrial (CPS1), mARN [NM_001875]                                                       | 0,91          | 35,55       |
| CD7             | NM_006137        | Homo sapiens CD7 molécula (CD7), mARN [NM_006137]                                                                                       | 20,39         | 145,67      |
| CCNA2           | NM_001237        | Homo sapiens ciclina A2 (CCNA2), mARN [NM_001237]                                                                                       | 0,88          | 52,42       |
| CB123670        | CB123670         | K-EST0172083 L12JSHC0 Homo sapiens clone cADN L12JSHC0-2-D12 5', sequência mARN [CB123670]                                              | 1,53          | 812,97      |

(continuação)

| Nome do gene | Nome sistemático | Descrição                                                                                       | Sinal materno | Sinal fetal |
|--------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|
| BC111482     | BC111482         | Homo sapiens clone cADN IMAGE:5743861, com intrão retido aparente. [BC111482]                   | 0,88          | 51,28       |
| BC089454     | BC089454         | Homo sapiens cADN clone MGC:105145 IMAGE:30563285, cds completo. [BC089454]                     | 0,84          | 51,55       |
| ALS2CL       | NM_147129        | Homo sapiens ALS2 C-terminal like (ALS2CL), variante transcrito 1, mARN [NM_147129]             | 2,96          | 14,83       |
| AK000420     | AK000420         | Homo sapiens cADN FLJ20413 fis, clone KAT02170. [AK000420]                                      | 0,91          | 113,52      |
| AHNAK        | NM_001620        | Homo sapiens AHNAK nucleoproteína (desmoikina) (AHNAK), variante transcrito 1, mARN [NM_001620] | 2,53          | 1672,13     |
| ADAM 11      | NM_002390        | Homo sapiens ADAM domínio metalopeptidase 11 (ADAM11), mARN [NM_002390]                         | 0,99          | 21,49       |
| ACVR2B       | NM_001106        | Homo sapiens recetor de activina A, tipo IIB (ACVR2B), mARN [NM_001106]                         | 5,13          | 39,23       |
| ABHD2        | NM_007011        | Homo sapiens domínio abhidrolase contendo 2 (ABHD2), variante transcrito 1, mARN [NM_007011]    | 0,96          | 21,99       |

## Exemplo de Referência 2

Identificação de células fetais de uma amostra de sangue materno usando ligandos.

Depleção de células maternas CD45 e GPA positivas.

Amostras de sangue materno usadas para a identificação de células fetais usando ligandos específicos de células fetais são processadas como descrito no Exemplo 1. Depois da centrifugação final a 500g durante 10 minutos o sobrenadante é eliminado, e o sedimento de células é re-suspendido em 80 µL por 10<sup>7</sup> células de PBS frio com BSA a

0,5% e EDTA 2 mM usando uma microponeta pré-revestida. 20  $\mu$ L de microesferas CD45 e 40  $\mu$ L de microesferas GPA são adicionados. Após mistura usando uma microponeta pré-revestida as células são incubadas durante 15 minutos a 40°C. As células são lavadas adicionando 5 mL de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM e centrifugadas a 500g durante 10 minutos. O sobrenadante é removido, e o sedimento de células é re-suspendido em 2 mL de PBS com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM usando uma ponta de pipeta pré-revestida. A suspensão celular é carregada numa coluna LD pré-lavada e o fluxo que a atravessa é recolhido num tubo novo pré-revestido. Depois da suspensão celular ter percorrido a coluna, esta é lavada 3 vezes com 1 mL de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM. O tubo contendo o fluxo que atravessou a coluna é depois centrifugado a 500g durante 10 minutos. O sobrenadante é eliminado e o sedimento celular é re-suspendido em 400 - 600  $\mu$ L (se forem 24 mL de sangue) de PBS com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM usando pontas de pipeta pré-revestidas e as células são colocadas em lâminas revestidas com polilisina e as lâminas são secas ao ar durante a noite. Uma amostra de sangue de 24 mL normalmente origina 10 a 15 lâminas com uma área de esfregaço celular de 15 x 15 mm por lâmina.

Identificação de células fetais.

As células fetais são identificadas usando um anticorpo contra o produto de um dos genes expressos preferencialmente nas células fetais tal como for exemplo sinaptotagmina IX a qual é o produto de SYT9.

Após secagem ao ar, as lâminas são re-hidratadas em 4xSSC durante 5 minutos, depois pré-incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com 100  $\mu$ L de tampão bloqueador que consiste em 4xSSC contendo BSA 1% e reagente bloqueador

0,5% (Roche). As lâminas são depois incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com 100 µL de solução biotinilada de anticorpo primário diluída em tampão bloqueador de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação do anticorpo, as lâminas são lavadas três vezes durante 5 minutos em 4xSSC. Para detetar anticorpo ligado às células fetais, as lâminas são incubadas com 100 µL de estreptavidina conjugada com FITC diluído 1:100 em tampão bloqueador durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de lavar duas vezes durante 5 minutos cada em 4xSSC e uma vez durante 5 minutos em 2xSSC, as lâminas foram montadas em Vectashield contendo 1,5 µg de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) para contra-corar os núcleos.

As células fetais coradas com anticorpo são identificadas por varredura automática usando o programa Metafer desenvolvido por Metasystems. As lâminas são varridas a uma amplificação de 10x usando um classificador desenvolvido internamente otimizado para detetar células coradas com sinaptotagmina. A verdadeira origem fetal das células coradas com anticorpo pode ser confirmada por FISH XY como descrito no Exemplo 1.

### **Exemplo 3**

Enriquecimento das células fetais de uma amostra de sangue materno

Marcação com anticorpo

As amostras de sangue materno usadas para enriquecimento de células fetais usando um ligando específico de células fetais são processadas como descrito no Exemplo 1. Depois da centrifugação final a 500 g durante 10 minutos, o sobrenadante é eliminado, e o sedimento celular é re-

suspendido em 95  $\mu$ L de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM por  $10^7$  células. 5  $\mu$ L por  $10^7$  células de anticorpo TMEFF biotinilado são adicionados usando pontas de pipetas pré-revestidas. Após mistura, as células são incubadas durante 30 a 60 minutos a 40°C ou à temperatura ambiente. Após incubação, as células são lavadas adicionando 5 mL de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM. Após centrifugação durante 10 minutos a 500 g, o sobrenadante é eliminado e o sedimento celular é re-suspendido em 80  $\mu$ L de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM por  $10^7$  células. 20  $\mu$ L de microesferas de anti-biotina por  $10^7$  células são adicionados usando uma ponta de pipeta pré-revestida. Após mistura, as células são incubadas durante 30 minutos a 40°C. As células são novamente lavadas adicionando 5 mL de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM. Após centrifugação durante 10 minutos a 500 g, o sobrenadante é eliminado, e o sedimento celular é re-suspendido em 5 mL de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM.

#### Seleção positiva usando MACS

Uma coluna LD pré-lavada e uma coluna MS pré-lavada são colocadas nos ímãs empilhadas. A suspensão de células marcadas é aplicada à LD de cima. Quando as células percorreram a coluna LD, esta é lavada duas vezes com 2 mL de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM. A coluna LD é removida do ímã e colocada num novo tubo de centrifugação de 15 mL pré-revestido. As células são eluídas aplicando 2 vezes 5 mL de PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM. Os primeiros 5 mL de tampão percorrem a coluna sem aplicar o êmbolo. Os segundos 5 mL de tampão percorrem a coluna aplicando o êmbolo. A coluna MS é depois removida do ímã e colocada no tubo de recolha. As células são eluídas do mesmo modo como para a coluna LD usando 2 vezes 1 mL de tampão frio em vez de 2 x 5 mL. O tubo de recolha é

centrifugado durante 10 minutos a 500 g. O sobrenadante é eliminado e o sedimento celular é re-suspendido em PBS frio com BSA a 0,5% e EDTA 2 mM. A suspensão celular é depois colocada numa lâmina revestida com polilissina, e a lâmina é seca ao ar antes de ser analisada novamente.

#### Deteção de células fetais masculinas

Células fetais masculinas isoladas usando o anticorpo TMEFF são identificadas por FISH XY seguido de varredura automática e validação manual como descrito no Exemplo 1. A origem fetal das células fetais candidatas é confirmada por FISH de cor reversa como descrito no Exemplo 1.

#### **Exemplo de Referência 4**

##### Análise de cromossomas das células fetais do sangue materno

Análise de síndrome de Down em células fetais de sangue materno é feita por FISH usando o LSI 21 de Abbott Molecular. Antes de FISH, a lamella é lavada durante 10 minutos de incubação em 2xSSC. A lamina é depois lavada em PBS, e desidratada em concentrações crescentes de etanol. Após secagem ao ar, 10 mL da mistura de sondas são aplicados na posição na lâmina onde as células fetais estão localizadas e a mistura é dispersada cobrindo a área com uma lamela de 22 x 22 mm. A lamella é depois selada com cola de borracha, e os ADN's são desnaturados numa placa aquecida durante 7 minutos a 83,5 °C, e hibridizadas durante a noite numa atmosfera humidificada a 37°C. No dia seguinte, as lâminas hibridizadas são lavadas a 73°C durante 2 minutos em 0,4 x SSC com Tween 20 0,3% seguido por 1 minuto em 2 x SSC com Tween 200,1% à temperatura ambiente. As lâminas são montadas em Vectashield contendo 1,5 mg/mL de DAPI como contra-coloração. O número de sinais

FISH do cromossoma 21 presentes nas células fetais é contado ao microscópio por realocização das células específicas usando o arquivo de varredura original.

### **Exemplo de Referência 5**

Identificação de mARNs expressos preferencialmente nas células fetais de uma amostra de sangue materno, enriquecida usando seleção positiva CD105.

Amostras de sangue periférico de mulheres grávidas são fixadas, os glóbulos vermelhos são lisados, e os glóbulos brancos permeabilizados como descrito no Exemplo 1.

A 500 µL de suspensão celular foram adicionados 130 µL de microesferas CD105 (Miltenyi) e a suspensão celular foi incubada durante 60 minutos a 40°C. As células foram depois lavadas adicionando 6 mL de tampão MACS frio seguido de centrifugação durante 10 minutos a 500 g. O sobrenadante foi removido e as células re-suspendidas em 2 mL de tampão MACS frio.

A suspensão celular marcada com CD105 foi aplicada a uma coluna MS pré-lavada (Miltenyi) já colocada no íman e empilhada sobre uma coluna MS pré-lavada (Miltenyi). Quando as células percorreram a coluna LD, esta foi lavada duas vezes com 2 mL de tampão MACS frio. A coluna MS foi lavada com 1 mL de tampão MACS frio. A coluna LD foi depois removida do íman, colocada num tubo de 15 mL pré-revestido, e as células foram eluídas aplicando 2 vezes 5 mL de tampão MACS frio. Os primeiros 5 mL de tampão percorreram a coluna sem aplicação do êmbolo. Os segundos 5 mL de tampão foram forçados através da coluna aplicando o êmbolo. A coluna MS foi depois removida do íman e colocada no tubo de recolha. As células foram eluídas do mesmo modo que a coluna LD

usando 2 vezes 1 mL de tampão MACS frio em vez de 2 vezes 5 mL de tampão. O tubo de recolha foi centrifugado a 500 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o sedimento celular foi re-suspendido em tampão MACS frio. A suspensão celular foi depois colocada em lâminas revestidas com poli-lisina, e as lâminas foram secas ao ar (durante a noite) antes de serem novamente analisadas.

Células fetais masculinas foram identificadas por FISH específico para cromossomas X e Y e varredura automática. Antes da hibridização, as lâminas foram lavadas em PBS durante 5 minutos e desidratadas durante 3 minutos cada em 60%, 80% e 99,9% de etanol. O ADN alfa satélite CEP X da sonda DXZ1 de repetição específica de cromossomas marcado com espectro do verde e o satélite III CEP Y da sonda DYZ1 marcado com espectro laranja (Abbott Molecular) foram usados para esta análise. As misturas de hibridização contendo ambas as sondas foram preparadas misturando 1 parte da sonda-X, 1 parte da sonda-Y, 1 parte de água destilada e 7 partes de tampão de hibridização. Quinze µL da mistura de hibridização foram adicionados e cobertos por uma lamela 24 x 24 mm. As lamelas foram seladas com cola de borracha, e os ADNs desnaturados numa placa aquecida a 83,50C durante 7 minutos e hibridizadas durante a noite numa atmosfera humidificada a 420C. Lâminas hibridizadas foram lavadas durante 2 minutos a 730C em 0,4 x SSC com Tween 20 0,3% e durante 1 minuto à temperatura ambiente em 2xSSC com Tween 200,1%. As lâminas foram depois montadas em Vectashield com DAPI.

As células contendo um sinal FISH vermelho localizado num núcleo corado com DAPI foram identificadas por varredura automática usando dois tipos diferentes de equipamento. O sistema de varredura de lâminas MDS (versão 5.8.0) originalmente desenvolvido por Applied Imaging, e o sistema

de varredura MetaCyte desenvolvido por Metasystems. Com o sistema de varredura MDS, as lâminas foram analisadas numa ampliação de 20X usando a função de varredura 5. Com MetaCyte, as lâminas foram analisadas a uma ampliação de 10x usando um classificador desenvolvido e otimizado internamente para deteção de sinais FISH verdadeiros de Espectro Laranja. Após varredura, as células identificadas pelo leitor foram inspecionadas visualmente por relocalização automática. As células que tinham um sinal X verde e um sinal Y laranja significativamente maior que o sinal X foram classificadas como células fetais masculinas.

Células fetais masculinas positivas duas vezes a 98 CD105 identificadas por um FISH XY e duas vezes a 980 que circunda as células maternas são isoladas por Microdisseção a Laser e Catapultagem com Pressão como descrito no exemplo 1. O ARN das duas amostras fetais e das duas amostras controlo são amplificados por Miltenyi Biotec pelo seu SuperAmp Service, e o cADN amplificado é usado para fazer dois PIQOR™ Stem Cell Microarray (a replicação biológica), como descrito no exemplo 1.

Os 24 genes adicionais resultado do microarranjo PIQOR (tabela 2) são selecionados com base em 3 critérios diferentes. Primeiro, o gene deve exibir uma proporção de sinal fetal/materno elevada ou relativamente elevada em ambos os microarranjos PIQOR feitos a partir de células fetais CD105 positivas hibridizadas uma vez (a replicação biológica). Adicionalmente, o gene deve exibir uma proporção de sinal fetal/materno elevada ou relativamente elevada em pelo menos um dos dois arranjos PIQOR feitos a partir das 23 células fetais não enriquecidas hibridizadas duas vezes (a replicação técnica). Finalmente, o gene deve exibir pouca ou nenhuma expressão em sangue inteiro

Tabela 2

| Símbolo do Gene | Número de Acesso          | Definição                                                                               | Proporção:<br>Sinal fetal/Sinal materno<br>(arranjos PIQOR) |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| THBD<br>(CD141) | MM_000361                 | Homo sapiens trombomodulina (THBD), mARN.                                               | 2,06 / 33 %<br>1,92 / 36 %<br>0,97 / 52 %<br>1,87 / 47 %    |
| FLT3<br>(CD135) | NM_004119                 | Homo sapiens tirosina quinase 3 (FLT3) relacionada com fms, mARN.                       | 2,32 / 30 %<br>1,83 / 11 %<br>1,92 / 58 %<br>2,00 / 21 %    |
| F3 (CD141)      | NM_001993                 | Homo sapiens fator III de coagulação (tromboplastina, fator tecidual) (F3), mARN.       | 2,66 / 46 %<br>2,10 / 25 %<br>1,87 / 60 %<br>1,87 / 14 %    |
| MCAM<br>(CD146) | NM_006500                 | Homo sapiens molécula de adesão de melanoma (MCAM), mARN.                               | 4,23 / 20 %<br>2,94 / 17 %<br>2,60 / 48 %<br>3,07 / 29 %    |
| CD33            | NM_001772                 | Homo sapiens molécula CD33 (CD33), variante transcrito 1, mARN.                         | 5,38 / 7 %<br>4,07 / 9 %<br>8,57 / 38 %<br>7,69 / 50 %      |
| CD68            | NM_001040059<br>NM_001251 | Homo sapiens molécula CD68 (CD68), variante transcrito 1 e variante transcrito 2, mARN. | 2,42 / 37 %<br>2,19 / 16 %<br>2,35 / 31 %<br>2,00 / 34 %    |
| CDH5<br>(CD144) | NM_001795                 | Homo sapiens caderina 5, tipo 2 (endotélio vascular) (CDH5), mARN.                      | 0,69 / - %<br>0,71 / - %<br>1,84 / 36 %<br>2,00 / 104 %     |

(continuação)

| Símbolo do Gene         | Número de Acesso          | Definição                                                                                                         | Proporção: Sinal fetal/Sinal materno (arranjos PIQOR)    |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| SELE (CD62E)            | NM_000450                 | Homo sapiens selectina E (SELE), mARN.                                                                            | 1,43 / 16 %<br>2,11 / 24 %<br>3,51 / 53 %<br>2,98 / 27 % |
| GJA5 (GAP)              | NM_181703                 | Homo sapiens proteína de junção gap, alfa 5, 40kDa (GJA5), variante transcrito B, mARN.                           | 1,95 / 45 %<br>1,82 / 21 %<br>0,97 / 49 %<br>1,24 / 39 % |
| ITGA5                   | NM_002205                 | Homo sapiens integrina, alfa 5 ( recetor de fibronectina, alfa polipéptido) (ITGA5), mARN.                        | 3,25 / 33 %<br>2,51 / 17 %<br>1,88 / 53 %<br>2,25 / 56 % |
| KCNK3 (TASK-1)          | NM_002246                 | Homo sapiens canal de potássio, subfamília K, membro 3 (KCNK3), mARN.                                             | 2,04 / 37 %<br>1,90 / 28 %<br>1,73 / 40 %                |
| CNTFR                   | NM_001842<br>NM_147164    | Homo sapiens recetor do fator neurotrófico ciliar (CNTFR), variante transcrito 1 e variante transcrito 2, mARN.   | 3,31 / 28 %<br>2,62 / - %<br>3,49 / 53 %                 |
| F11R (JAM-1)            | NM_016946                 | Homo sapiens recetor F11 (F11 R), mARN.                                                                           | 4,43 / 30 %<br>3,56 / 22 %<br>2,52 / 3 %<br>3,32 / 55 %  |
| SDC4 (Syndecan 4)       | NM_002999                 | Homo sapiens sindecan 4 (SDC4), mARN.                                                                             | 2,01 / 11 %<br>1,73 / 40 %<br>2,19 / 19 %                |
| ACVR2B                  | MM_001106                 | Homo sapiens recetor de activina A, tipo IIB (ACVR2B), mARN.                                                      | 1,90 / 0 %<br>1,48 / 9 %<br>1,39 / 41 %<br>1,74 / 27 %   |
| ACVR2A                  | NM_001616                 | Homo sapiens recetor de activina A, tipo IIA (ACVR2A), mARN.                                                      | 1,30 / 17 %<br>2,08 / 23 %<br>2,60 / 44 %<br>1,76 / 30 % |
| CD44 (CD44v6+ CD44v4/5) | NM_000610<br>MM_001001389 | Homo sapiens molécula CD44 (grupo de sangue Indiano) (CD44), variante transcrito 1 e variante transcrito 2, mARN. | 1,30 / 24 %<br>3,23 / 77 %<br>7,09 / 75 %<br>1,96 / 48 % |
| STX1A                   | NM_004603                 | Homo sapiens syntaxina 1A (cérebro) (STX1A), mARN.                                                                | 5,09 / 26 %<br>4,23 / 62 %<br>4,80 / 55 %                |

(continuação)

| Símbolo do Gene     | Número de Acesso                       | Definição                                                                                                                                         | Proporção: Sinal fetal/Sinal materno (arranjos PIQOR)    |
|---------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| TEK (Tie2)          | NM_000459                              | Homo sapiens TEK tirosina endotelial (TEK), mARN                                                                                                  | 2,13 / 31 %<br>2,23 / 55 %<br>2,37 / 65 %                |
| L1CAM (CD171)       | NM_000425<br>NM_024003                 | Homo sapiens molécula de adesão celular L1 (L1 CAM), variante transcrito 1 e variante transcrito 2, mARN.                                         | 1,98 / 35 %<br>2,37 / 22 %<br>2,37 / 61 %<br>2,18 / 28 % |
| NCAM1 (CD56)        | NM_000615<br>NM_001076682<br>NM_181351 | Homo sapiens molécula de adesão celular neural 1 (NCAM1), variante transcrito 1, variante transcrito 2 e variante transcrito 3, mARN.             | 0,90 / - %<br>1,60 / 17 %<br>3,83 / 54 %<br>2,10 / 27 %  |
| ALPP                | NM_001632                              | Homo sapiens fosfatase alcalina, placentária (isozima Regan) (ALPP), mARN                                                                         | 1,63 / - %<br>1,83 / 13 %<br>3,10 / 52 %<br>1,70 / 93 %  |
| ALPPL2              | NM_031313                              | Homo sapiens fosfatase alcalina, tipo placentária 2 (ALPPL2), mARN.                                                                               | 1,16 / 82 %<br>5,46 / 44 %<br>7,91 / 22 %<br>2,26 / 61 % |
| MMP23B (and MMP23A) | NM_006983<br>NR_002946                 | Homo sapiens metalopeptidase de matriz 23B (MMP23B), mARN. Homo sapiens metalopeptidase de matriz 23A (pseudogene) (MMP23A), ARN não codificante. | 0,86 / 52 %<br>1,11 / 56 %<br>2,80 / 67 %<br>2,05 / 54 % |

Lisboa, 27 de Março de 2015

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método para detetar uma célula fetal compreendendo os passos de
  - a. Fornecer uma amostra de sangue materno ou uma fração desta
  - b. Fixar as células
  - c. Contactar a amostra com
    - i. uma sonda de hibridação dirigida a um ácido nucleico que compreende pelo menos 10 pb de um gene expresso diferencialmente nas células fetais de uma amostra de sangue materno em que o gene é TMEFF2 ou
    - ii. um ligando dirigido a um antigénio codificado por um gene expresso diferencialmente nas células fetais de uma amostra de sangue materno em que o gene é TMEFF2.
2. O método da reivindicação 1, compreendendo adicionalmente um passo de identificação das células fetais da amostra ou um passo de enriquecimento das células fetais da amostra.
3. O método de qualquer uma das reivindicações 1 e 2, em que a identificação compreende detetar a presença do ligando ou da sonda de hibridação sobre ou nas células fetais.
4. O método da reivindicação 2, em que o enriquecimento compreende contactar a amostra de sangue materno com um ligando dirigido a um antigénio exposto à superfície da célula codificado por um gene selecionado a partir do grupo que consiste em tomoregulina, EDN1, AHNAK, , CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, T de Rato, ACVR2B, CD141, CD135, CD142/F3, CD146, CD33, CD68, CD144, CD62E, GAP/GJA5, ITGA5,

KCNK3/TASK-1, CNTFR, JAM-1, SDC4/Syndecan 4, ACVR2B, ACVR2A, CD44v6+CD44v4/5, STX1A, TEK/Tie2, CD171, NCAM/CD56, ALPP, ALPPL2 e MMP23A/MMP23B.

Lisboa, 27 de Março de 2015