

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 983**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2010 E 18205662 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3470534**

54 Título: **Enriquecimiento e identificación de células fetales en sangre materna y ligandos para dicho uso**

30 Prioridad:

07.01.2009 DK PA200900020
04.10.2009 DK PA200901084

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2024

73 Titular/es:

ARCEDI BIOTECH APS (100.0%)
Tabletvej 1
7100 Vejle, DK

72 Inventor/es:

CHRISTENSEN, BRITTA;
KØLVBRÅ, STEEN;
ECKELT, ANDREAS;
BRINCH, MARIE;
SINGH, RIPUDAMAN y
HATT, LOTTE

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 985 983 T3

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

DESCRIPCIÓN

Enriquecimiento e identificación de células fetales en sangre materna y ligandos para dicho uso

5 Antecedentes

10 El examen de células fetales para la detección temprana de enfermedades fetales y anomalías genéticas se lleva a cabo en relación con muchos embarazos, en particular cuando la edad materna es alta (35 años o más) o cuando se conocen enfermedades genéticas en la familia. Las células fetales se pueden obtener por amniocentesis, la extracción de líquido amniótico de la cavidad amniótica dentro del saco amniótico o por biopsia de corion, donde se toman biopsias de la placenta, lo que se denomina muestreo invasivo.

15 La exploración de aneuploidía prenatal emplea análisis de cromosomas tradicionales o sondas de ADN específicas de cromosomas para la elucidación de las aberraciones numéricas de los cromosomas más anormales, en particular los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en el feto.

20 Debido a la invasión de los procedimientos de muestreo descritos anteriormente y al riesgo de aborto, sería ventajoso realizar un diagnóstico fetal mediante un procedimiento no invasivo, tal como por ejemplo mediante el uso de una muestra de sangre materna.

25 Durante el embarazo, una diversidad de tipos de células de origen fetal atraviesan la placenta y circulan dentro de la sangre periférica materna. La viabilidad del uso de células fetales en la circulación materna para fines de diagnóstico se ha visto obstaculizada por el hecho de que las células fetales están presentes en la sangre materna en números muy limitados, los números reportados han sido de una célula fetal por 10^5 - 10^8 células maternas nucleadas o 1-10 células fetales por ml de sangre materna. Además, la mayoría de las células fetales no se pueden distinguir de las células maternas basándose únicamente en la morfología, por lo que se han investigado procedimientos alternativos de identificación de células fetales.

30 El documento US2007/0015171 describe un procedimiento no invasivo para el aislamiento y la detección del ADN fetal. El procedimiento enriquece una muestra de sangre materna usando anticuerpos que se unen específicamente a las células maternas y/o anticuerpos que se unen específicamente a las células fetales. Los inventores sugieren el uso de algunos de los anticuerpos mencionados específicamente: HLe-1 es un anticuerpo que reconoce un antígeno presente en leucocitos humanos maduros y en precursores de eritrocitos muy inmaduros, pero no eritrocitos nucleados maduros. Por lo tanto, se sugiere que este anticuerpo puede usarse para reconocer leucocitos maternos, pero no eritrocitos nucleados fetales. También se sugieren anticuerpos anti-monocitos (M3) y anticuerpos anti-linfocitos (L4) para eliminar las células maternas de una muestra. Finalmente, los autores sugieren usar un anticuerpo monoclonal, que reconozca el receptor de la transferrina (TfR) en las células fetales. El ADN de células fetales aisladas se pone posteriormente a disposición para detección. El ADN de las células fetales aisladas se pone posteriormente a disposición para su detección y diagnóstico.

45 El documento WO 2007/065438 describe la detección de células fetales en sangre materna mediante la fijación y permeabilización de células nucleadas presentes en la muestra de sangre y la adición de una sonda de hibridación. Sin embargo, el documento WO 2007/065438 no especifica ninguna sonda de hibridación específica para la detección de células fetales en sangre materna.

50 El documento WO 01/79851 proporciona métodos para la expansión selectiva de células fetales obtenidas a partir de sangre fetal. El documento WO 01/79851 muestra que las células después de la expansión expresan un perfil de marcadores específico, incluyendo CD105, y que las células fetales expandidas pueden detectarse en sangre adulta de sexo no coincidente usando CD45^{-ve}

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de procedimientos mejorados para aislar células fetales de muestras de sangre materna para facilitar la detección y el diagnóstico prenatales.

55 Resumen de la invención

La invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier materia que no entre en el ámbito de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

60 La invención se refiere a un método de detección de una célula fetal que comprende las etapas de:

a. Proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma

b Fijar las células de la muestra de sangre materna o de su fracción,

65

c. Lisis selectiva de los eritrocitos, y

d. Poner en contacto las células fijadas resultantes de la etapa c. con un ligando dirigido a un antígeno codificado por un gen CD105 expresado diferencialmente en células fetales de una muestra de sangre materna.

5 El método puede comprender además una etapa de identificación de las células fetales de la muestra o una etapa de enriquecimiento de las células fetales de la muestra dependiente del ligando o dependiente de la sonda de hibridación.

En una realización, la identificación comprende detectar la presencia del ligando en o sobre las células fetales.

10

El enriquecimiento puede comprender el contacto de la muestra de sangre materna con un ligando dirigido a un antígeno expuesto a la superficie celular codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en 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 y MMP23A/MMP23B.

15

Después del enriquecimiento y/o identificación, la célula o células fetales se someten típicamente a una etapa de detección, de modo que se puede realizar una etapa de predicción y/o diagnóstico del feto.

20

Divulgación de la invención

La presente invención se basa en la identificación de los ARNm que codifican proteínas que se expresan preferentemente en células fetales de una muestra de sangre materna. Es decir, los ARNm están presentes en niveles aumentados en las células fetales en comparación con los niveles de ARNm en células sanguíneas maternas. Por lo tanto, los ARNm identificados pueden usarse para la identificación de células fetales en una muestra de sangre materna mediante la detección o cuantificación del ARNm o la proteína codificada por el ARNm. Cuando el término detección se usa en este documento, abarca tanto la detección como la cuantificación. Sin embargo, en dos realizaciones separadas, el término detección abarca la detección o la cuantificación. En general, el experto en la materia reconocerá cuando la detección también abarca la cuantificación, es decir, cuando es relevante cuantificar los niveles de ARNm o los niveles de la proteína codificada por los ARNm. Esto puede por ejemplo, necesitarse para la detección de un ARNm determinado que se expresa a un nivel bajo en células maternas (pero no ausente) y donde el mismo ARNm se expresa, por ejemplo, a niveles 3 veces mayores que en célula fetales.

25

30

35

Un subconjunto de los ARNm codifica proteínas expuestas en la superficie, y estas proteínas se pueden usar como antígenos para ligandos tales como aptámeros o anticuerpos y el uso de estos ligandos permite el enriquecimiento y/o la identificación de células fetales de una muestra de sangre materna. Dicho enriquecimiento es deseable porque las células fetales obtenidas de sangre materna pueden usarse para la detección y el diagnóstico prenatales.

40

Otro descubrimiento que los presentes inventores han hecho es que una etapa de fijación de las células de la muestra materna ayuda en gran medida a la identificación y el enriquecimiento de las células fetales de la muestra. Esta etapa de fijación se puede realizar junto con los procedimientos de enriquecimiento y/o identificación de células fetales descritos en este documento o junto con procedimientos de enriquecimiento y/o identificación de células fetales que se han descrito en la técnica anterior (por ejemplo el documento US2007/0015171 descrito en la sección de antecedentes).

45

Fijación de las células de una muestra de sangre materna

50

La invención se basa en el descubrimiento de que la fijación de las células de una muestra de sangre materna aumenta considerablemente la estabilidad de las células fetales en una muestra de sangre materna, mientras que permite el enriquecimiento y la identificación de las células fetales, por ejemplo, como se describe en el presente documento. El procedimiento de fijación se puede realizar en una muestra de sangre no enriquecida inmediatamente después del muestreo, lo que da como resultado la fijación de todos los componentes celulares en la muestra de sangre materna. Al mismo tiempo, la fijación es tan leve que los eritrocitos maternos pueden lisarse selectivamente en una etapa de lisis posterior.

55

Así, el método puede comprender las etapas siguientes

60

a. Proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma

b. Poner en contacto la muestra con una solución de fijación

65

Preferentemente, la muestra de sangre materna se pone en contacto con la solución de fijación inmediatamente después de que se haya obtenido la muestra. El término inmediatamente como se usa en el presente contexto significa que la muestra no está sujeta a ninguna otra manipulación antes de ser contactada con la solución de

ES 2 985 983 T3

fijación. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con la solución de fijación no más de 24 horas después de que se haya proporcionado la muestra. Más preferentemente, la muestra se pone en contacto con la solución de fijación no más de 12 horas, tal como 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 15 minutos
5 después de que se haya proporcionado la muestra. Más preferentemente, la muestra se pone en contacto con la solución de fijación no más de 1 hora después de que se haya proporcionado la muestra.

En otra realización preferida, la solución de fijación se añade a la sangre completa y preferentemente antes de una etapa de sedimentación opcional tal como, por ejemplo, sedimentación por gravedad o sedimentación por centrifugación.
10

La fijación se realiza preferentemente entre 1 y 60 minutos. Más preferentemente, la fijación se realiza entre 5 y 30 minutos y, lo más preferentemente, la fijación se realiza entre 5 y 15 minutos, tal como 10 minutos.

La solución de fijación comprende preferentemente entre el 2,5 % y el 7,5 % de paraformaldehído, más preferentemente entre el 3 % y el 6 %, y lo más preferentemente entre el 4 % y el 5 %.
15

Además del paraformaldehído, la solución de fijación comprende preferentemente sal en una concentración entre 0,05 M y 0,3 M. Más preferentemente, la concentración está entre 0,1 y 0,2 M y la más preferida es una concentración entre 0,125 y 0,175 M. La sal es preferentemente LiCl, KCl, NaCl o PBS, siendo PBS el más preferido.
20

Cuando se usan las concentraciones mencionadas anteriormente de la solución de fijación, se prefiere añadir entre 0,2 y 10 volúmenes de la solución de fijación a la muestra de sangre materna para la fijación, más preferentemente entre 0,5 y 5 volúmenes y lo más preferentemente se añade entre 1 y 3 volúmenes. Típicamente se añaden 2 volúmenes. En otra realización más, se prefiere añadir entre 1/3 y 3/3 volúmenes de solución de fijación, por ejemplo, 2/3 volúmenes.
25

El experto en la materia tendrá claro que las diversas concentraciones de la solución de fijación y los números de veces de la dilución se pueden ajustar para obtener las concentraciones finales deseadas una vez que la solución de fijación se haya añadido a la muestra de sangre materna. Preferentemente, la concentración final de paraformaldehído está entre 2 y 6 %, más preferentemente entre 3 y 5 % y lo más preferentemente entre 3,5 % y 4,5 %. Una concentración final típica es del 4 %.
30

Preferentemente, a la etapa de fijación le sigue una etapa de lisis que comprende:
35

c. Poner en contacto la muestra fijada con un tampón de lisis

- en donde el tampón de lisis comprende un detergente no iónico, preferentemente Triton X-100. Las concentraciones preferidas del detergente están entre el 0,01 % y el 0,5 %, más preferentemente entre el 0,05 % y el 0,3 %, y lo más preferentemente el 0,1 %.
40

En una realización preferida, la etapa de lisis se realiza inmediatamente después de la etapa de fijación.

Como se mencionó anteriormente, la etapa de lisis permite sorprendentemente la lisis selectiva de los eritrocitos maternos.
45

La invención puede involucrar el uso de la solución de fijación para fijar células fetales en una muestra de sangre materna o una fracción de la misma, como se describe en el presente documento.

La invención puede involucrar el uso del tampón de lisis para la lisis selectiva de eritrocitos maternos en una muestra de sangre materna o una fracción de la misma, como se describe en el presente documento.
50

Poner en contacto la muestra de sangre materna con un ligando o una sonda

También se divulga para su uso en el ámbito de la invención reivindicada un método que comprende las etapas de
55

a. Proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma

b. Poner en contacto la muestra con
60

i. una sonda de hibridación dirigida a un ácido nucleico que comprende al menos 10 pb de un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en 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, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGD2, RP11-
65

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 y
5 MMP23A/MMP23B o

ii. un ligando dirigido a un antígeno codificado por un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en 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, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGD2, 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 y MMP23A/MMP23B.
10
15

Los productos génicos de los genes se identifican en la tabla 1, así como también los niveles de expresión en las células fetales y maternas. En los ejemplos se muestran los experimentos que verifican que los ARNm de estos genes se expresan preferentemente en células fetales de una muestra de sangre materna.
20

La expresión "una fracción de la misma" se usa para indicar que la muestra de sangre materna se puede poner en contacto directamente con un ligando o una sonda de hibridación o que la muestra de sangre materna se puede preprocesar para que solo comprenda una fracción de la muestra de sangre materna original al ser contactada con el ligando o sonda de hibridación. La muestra de sangre materna puede, por ejemplo, estar sujeta a la concentración de sus células, una etapa de coagulación o una etapa de enriquecimiento como se describe en el presente documento antes de ponerse en contacto con el ligando o la sonda de hibridación.
25

Sondas de hibridación

Las sondas de hibridación se usan generalmente en la técnica y son típicamente ADN o ARN, preferentemente ADN. En realizaciones preferidas, las sondas se modifican con nucleótidos no naturales que mejoran la afinidad de unión y/o la especificidad de unión. Ejemplos preferidos de dichos nucleótidos no naturales son LNA (ácidos nucleicos bloqueados), TINA (ácidos nucleicos de intercalación retorcidos), PNA (ácido nucleico peptídico), INA (ácidos nucleicos de intercalación), morfolino y monómeros de ARN sustituidos en 2'O tales como monómeros ARN 2'O-metil y ARN 2'O-(2-metoxietil).
30
35

La longitud de las sondas está preferentemente entre 10 y 30 nucleótidos, más preferentemente 15-25 nucleótidos.

40 Colorantes reporteros

Las sondas de hibridación y los ligandos a usar de acuerdo con la invención pueden comprender un colorante reportero (también denominado en este documento marcador). Preferentemente, el colorante reportero se selecciona de entre el grupo que consiste en FAM[™], TET[™], JOE[™], VIC[™], SYBR[®] Green, 6 FAM, HEX, TET, TAMRA, JOE, ROX, Fluoresceína, Cy3, Cy5, Cy5.5, Texas Red, Rhodamine, Rhodamine Green, Rhodamine Red, 6-CarboxyRhodamine 6G, Alexa Fluor, Oregon Green 488, Oregon Green 500 y Oregon Green 514.
45

En una realización, las sondas de hibridación también comprenden un colorante de extinción. En una realización preferida, el colorante de extinción se selecciona de entre el grupo que consiste en TAMRA[™], Black Hole Quencher[™], DABCYL, BHQ-1, BHQ-2, DDQ I, DDQ II y Eclipse Dark Quencher.
50

El uso de reportero y colorante de extinción es deseable porque permite diversos tipos de cuantificaciones además de la identificación.

Típicamente el colorante reportero y el colorante interruptor están ubicados cerca uno del otro en la sonda de hibridación, lo que permite que la fluorescencia inducida por la luz o el láser sea emitida por el inhibidor reportero a extinguir con el colorante interruptor. Cuando el oligonucleótido se une a una hebra de molde complementaria, el colorante reportero y el colorante interruptor se separan entre sí de manera que el interruptor ya no apaga la señal del reportero, es decir, se puede detectar la hibridación.
55
60

Por lo tanto, en una realización, la sonda de hibridación es capaz de formar una estructura de vástago-bucle, donde el interruptor y el colorante reportero se ponen en proximidad en el vástago. En una realización, el oligonucleótido es una denominada baliza molecular. El interruptor y el reportero ya no están cerca, cuando la base de baliza molecular se empareja con una hebra de molde. Por lo tanto, la señal inducida por láser del colorante reportador ya no se extingue.
65

En lugar de usar un colorante reportero y un colorante interruptor, se puede usar un par denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) que comprende un fluoróforo donante y un fluoróforo aceptor. Cuando el fluoróforo donante es excitado por una fuente de luz externa, emite luz a una longitud de onda, que excita al fluoróforo aceptor, que a su vez emite luz a una longitud de onda diferente, que puede ser detectada y medida. La energía solo se transfiere del donante al aceptor si el fluoróforo donante y el fluoróforo aceptor están muy cerca.

Los pares de FRET preferidos incluyen BFP-YFP, CFP-YFP, GFP-DsRed, GFP-Cy3, GFP-mOrange, YFP-RFP, FAM-ROX, FAM-Cy5, FAM-Hex, FAM-TAMRA y Cy3-Cy5.

10 Ligandos

El ligando como se usa en el procedimiento de la invención es preferentemente un anticuerpo, un péptido o un aptámero.

15 Los aptámeros son ligandos de alta afinidad basados en ácidos nucleicos que se unen a antígenos tales como las proteínas. Típicamente se identifican usando técnicas de evolución in vitro tales como SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial). En SELEX, se usan rondas iteradas de selección y amplificación de ácidos nucleicos de una biblioteca inicial para la identificación de aptámeros de alta afinidad. Dado que la biblioteca inicial es muy grande (por ejemplo, 10^{14} secuencias diferentes) y las secuencias pueden mutarse durante rondas iteradas, la identificación de aptámeros de alta afinidad ahora se puede realizar de forma habitual y dichos procedimientos son conocidos por el experto. Los aptámeros preferidos tienen menos de 50 nucleótidos de longitud.

25 Se pueden generar péptidos de alta afinidad usando la presentación en fagos. En la presentación en fagos, se selecciona una biblioteca de péptidos que presentan fagos contra el objetivo y se amplifican posteriormente en un procedimiento de evolución similar al SELEX. Existen diversos sistemas para la presentación en fagos y el tamaño del péptido puede elegirse para satisfacer necesidades particulares. En una realización, los péptidos a usar con el procedimiento de la invención tienen un tamaño de menos de 50 aminoácidos.

30 A menudo, la biblioteca se presenta en un armazón, por ejemplo, un armazón de anticuerpos. Por lo tanto, la presentación en fagos puede usarse para identificar anticuerpos de alta afinidad. Otras técnicas de evolución in vitro para la generación de anticuerpos incluyen la presentación de ARNm, la presentación de ribosomas y la presentación de ADN covalente.

35 Los anticuerpos también se pueden generar usando la inmunización de animales adecuados, como ratones, ratas, cabras, conejos, caballos, etc.

40 Los anticuerpos usados para la presente invención pueden ser monoclonales o policlonales. Los procedimientos para generar ambos tipos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia. Además de los procedimientos de evolución in vitro descritos anteriormente, los anticuerpos monoclonales se preparan típicamente usando tecnología de hibridoma.

45 Especificidad de los ligandos

Preferentemente, los ligandos se unen específicamente a las células fetales. Cuando se hace referencia a la especificidad, lo que se quiere decir es que los ligandos tienen una mayor afinidad de unión para las células fetales que para las células maternas. La afinidad de unión puede expresarse en términos de una constante de disociación (kd) y especificidad como una relación entre la kd de un ligando dado para células maternas y la kd del mismo ligando para células fetales. Es decir, un ligando puede tener una kd de 10^{-5} M para las células maternas y de 10^{-9} M para las células fetales. En este caso, la especificidad sería de 10.000. Sin embargo, dado que tanto las células fetales como las maternas no son necesariamente una población homogénea, la especificidad también puede expresarse en términos del número de veces de enriquecimiento que se puede lograr con un ligando dado (como se describe más adelante).

55 En una realización preferida, la especificidad de los ligandos ha sido optimizada.

Preferentemente, el procedimiento comprende además una etapa de identificación de células fetales de la muestra y/o una etapa de enriquecimiento de células fetales de la muestra. En una realización preferida, la etapa de enriquecimiento se realiza antes de la etapa de identificación.

Después del enriquecimiento y/o identificación, a menudo se realiza una etapa de detección y una etapa de predicción y/o diagnóstico.

65 Identificación

Cuando el procedimiento comprende una etapa de identificación, una realización comprende detectar la presencia del ligando o la sonda de hibridación sobre o en las células fetales.

5 La detección se puede habilitar marcando el ligando o la sonda de hibridación con colorantes fluorescentes u otros colorantes adecuados para la detección. Por lo tanto, el procedimiento puede ser, por ejemplo, la hibridación in situ fluorescente (FISH). La sonda puede comprender un interruptor, así como un fluoróforo o un par FRET como se describe anteriormente, que permite la detección de sondas de hibridación unidas a sus secuencias diana. Como alternativa o además, las sondas que se unen a sus dianas se separan de las sondas no vinculantes mediante una o más etapas de lavado.

10 La identificación también se puede hacer usando la inmunotinción usando un ligando tal como un anticuerpo.

15 La identificación se puede hacer usando FISH multicolor o inmunotinción multicolor. Es decir, diferentes sondas de hibridación con diferentes marcadores fluorescentes pueden usarse simultáneamente o dos (o más) anticuerpos diferentes con diferentes marcadores fluorescentes pueden usarse simultáneamente. Ambos pueden ser específicos para las células fetales o uno puede ser específico para las células fetales y el otro puede ser específico para las células maternas.

20 Enriquecimiento

En una realización preferida, una etapa de enriquecimiento dependiente del ligando o dependiente de la sonda de hibridación se realiza después de que la muestra materna se haya puesto en contacto con el ligando o la sonda de hibridación. Para el enriquecimiento, se prefiere un ligando a una sonda de hibridación.

25 Cuando se hace referencia al enriquecimiento, lo que se quiere decir es que la relación de células fetales a células maternas de la muestra aumenta. El número de veces de enriquecimiento es preferentemente más de 1000 veces, incluso más preferentemente más de 10.000 veces y lo más preferentemente más de 100.000 veces.

30 En otra realización, el número de veces de enriquecimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en más de 10 veces, más de 100 veces, más de 1000 veces, más de 10.000 veces, más de 100.000 veces y más de 1.000.000 veces. La base del enriquecimiento son los ARNm identificados expresados preferentemente en células fetales y proteínas codificadas por los ARNm.

35 Una parte de los ARNm específicos de células fetales identificadas codifican antígenos expuestos en la superficie y en una realización preferida, el ligando se dirige a un antígeno expuesto en la superficie celular codificado por un gen seleccionado de entre el grupo que consiste 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 y MMP23A/MMP23B.

40 El uso de ligandos dirigidos a antígenos expuestos en la superficie específica de células fetales permite el enriquecimiento de células fetales a partir de una muestra materna sin permeabilizar las células (según sea necesario para antígenos intracelulares o ácidos nucleicos capturados por sondas de hibridación).

45 Como quedará claro para el experto en la materia, pueden realizarse etapas adicionales de enriquecimiento dependientes de antígeno basadas en ligandos (o antígenos) conocidos de la técnica anterior. Ejemplos de dichos antígenos conocidos de la técnica anterior son: CD34, Tra, Oct1, Crypto1 y SSEA1.

50 Clasificación basada en flujo

En una realización preferida, el enriquecimiento se realiza usando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Por lo tanto, el ligando está marcado con fluorescencia lo que permite FACS. El FACS y los marcadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia y los ejemplos se han dado anteriormente.

55 Como alternativa al FACS, se puede usar la clasificación de células de dispositivos microfluídicos.

Inmovilización

60 En otra realización preferida, el enriquecimiento se realiza usando la inmovilización de los ligandos. Los ligandos pueden, por ejemplo, inmovilizarse en perlas tales como perlas magnéticas, perlas de sefarosa, perlas de agarosa, etc. Cuando los ligandos y las células unidas a las mismas se inmovilizan, las células no unidas pueden lavarse de las perlas. Dicho procedimiento de lavado se puede realizar por lotes o en una columna. Después del enriquecimiento (fraccionamiento), las células unidas se pueden eluir usando sal alta o baja, enlazadores escindibles, pH alto o bajo, agentes desnaturizantes, etc. Más preferentemente, las células unidas se eluyen usando una elución competitiva con antígenos solubles o ligandos secundarios que se unen

a ligandos específicos de células fetales, por ejemplo, anticuerpos dirigidos a la parte fija del ligando usado para la inmovilización.

- 5 Un procedimiento preferido de enriquecimiento es MACS (clasificación de células inmunomagnéticas), donde los ligandos se inmovilizan en perlas magnéticas. Es decir, las células unidas a los ligandos se pueden separar de los no ligantes seleccionando las partículas mediante magnetismo.

Selección negativa usando antígenos

- 10 Los ligandos que se unen específicamente a las células maternas también pueden usarse para el enriquecimiento. Por lo tanto, en una realización preferida, el procedimiento comprende además una etapa de poner en contacto la muestra con un ligando específico de células maternas dirigido a un antígeno materno. Después de poner en contacto la muestra con un ligando específico de células maternas, el enriquecimiento se puede realizar, por ejemplo, usando FACS, MACS, microfluidos o inmovilización como se describe anteriormente.

- 15 Preferentemente, el ligando se selecciona de entre el grupo que consiste en ligandos que se unen a antígenos codificados por ARNm expresados preferentemente en células de sangre materna como se identifica por los presentes inventores.

- 20 Como será claro para el experto en la materia, se pueden usar etapas adicionales de enriquecimiento dependientes del antígeno (selecciones negativas) basadas en ligandos (o antígenos) conocidos de la técnica anterior. Por lo tanto, en una realización, se realiza una etapa adicional de enriquecimiento dependiente del antígeno, donde el ligando se selecciona de entre el grupo que consiste en ligandos que se unen a antígenos específicos maternos conocidos de la técnica anterior, tales como CD45, HLA-A, HLA-B o anticuerpos seleccionados de entre el grupo que consiste en HLe-1, M3 y L4.

- 30 Un marcador de tipo celular preferido para la selección negativa es CD45, también conocido como antígeno común de leucocitos. CD45 es una proteína transmembrana expresada por todas las células hematopoyéticas diferenciadas excepto eritrocitos y células plasmáticas. La proteína CD45 existe en diferentes formas, todas producidas a partir de un único gen complejo que da origen a ocho ARNm maduros diferentes y da como resultado ocho productos proteicos diferentes. Se expresa en todos los leucocitos pero no en otras células, y por lo tanto funciona como un marcador pan-leucocutivo que incluye los diferentes y diversos tipos de leucocitos (o glóbulos blancos) como los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos (células B y T), monocitos y macrófagos.

- 35 Debido a la expresión de CD45 en una gran mayoría de las células nucleadas presentes en la sangre materna, se prefiere una selección negativa usando el marcador CD45. Tras el agotamiento de las células positivas para CD45, se recogen las células negativas para CD45 de la muestra. Dicho agotamiento y recogida pueden realizarse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica.

HLA

- 45 Los antígenos de leucocitos humanos, parte del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano, son responsables de las proteínas presentadoras de antígenos de la superficie celular y muchos otros genes.

- 50 Hay dos clases de antígenos de leucocitos humanos, antígenos de clase I (A, B y C) y antígenos de clase II (DR, DP y DQ) que tienen funciones diferentes. Ambas clases incluyen un alto número de alelos variables. Los genes HLA no expresados por células fetales pueden usarse para el agotamiento de las células maternas en la muestra.

Otros procedimientos de enriquecimiento

- 55 También se pueden usar procedimientos de enriquecimiento adicionales que no usan ligandos específicos de antígeno.

- 60 Un procedimiento adicional preferido de enriquecimiento es la lisis de los eritrocitos, tales como la lisis mediada por NH₄Cl, que permite la lisis selectiva de eritrocitos dejando intactas las células nucleadas. Este procedimiento es conocido por un experto en la materia. Para la lisis mediada por NH₄Cl preferentemente se usa una concentración de NH₄Cl 0,1-0,2 mM, tal como NH₄Cl 0,14-0,18 mM, más preferentemente NH₄Cl 0,15-0,17 mM.

- 65 También los procedimientos de fijación y lisis selectiva descritos en el presente documento pueden usarse para el enriquecimiento.

La muestra también puede someterse a una separación inicial basada en el tamaño o la densidad, tal como

mediante centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Esto da como resultado la producción de una capa sobrenadante, que contiene plaquetas; una capa de células mononucleares; y un microgránulo aglutinado que contiene eritrocitos y granulocitos no nucleados. La capa mononuclear se separa de las otras capas para producir una muestra materna enriquecida en células fetales.

5

También las propiedades físicas de las células, tales como, pero no exclusivamente, la carga, pueden utilizarse para el enriquecimiento.

Combinación de ligandos y procedimientos de enriquecimiento

10

Como se entenderá, los diversos ligandos y procedimientos de enriquecimiento pueden combinarse. Por lo tanto, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más ligandos específicos de células fetales se pueden usar al mismo tiempo o en sucesión. Análogamente, se pueden usar los enriquecimientos iterados usando ligandos específicos de células fetales y ligandos específicos maternos.

15

La muestra

Es deseable obtener una muestra de sangre materna lo más grande posible con el fin de aumentar el número total de células fetales. Sin embargo, debido a problemas prácticos, la muestra debe estar dentro de determinados límites. En consecuencia, el tamaño de la muestra de sangre materna está preferentemente en el intervalo de 0,5 a 50 ml, tal como en el intervalo de 1 a 40 ml, tal como de 5 a 35 ml o de 10 a 30 ml.

20

La muestra de sangre materna proporcionada se obtiene preferentemente de una mujer embarazada de entre 5 -24 o 6-20 semanas de gestación, más preferentemente entre 7-16, u 8-12 semanas de gestación.

25

Dilución-concentración

Además, de acuerdo con la invención, la muestra puede diluirse o concentrarse en cualquier momento durante el enriquecimiento del procedimiento o la identificación de una célula fetal (para facilitar la identificación de las células fetales y en relación con la viabilidad de las diferentes etapas del procedimiento). La muestra puede diluirse al menos 1,5 veces, como dos veces, más preferida, al menos tres veces, como cinco veces añadiendo tampones isotónicos, tales como soluciones salinas, soluciones salinas tamponadas con fosfato, PBS y/o medios de crecimiento adecuados, tales como medio basal, y medio de crecimiento de tejidos. Una etapa del procedimiento puede incluir la dilución de una muestra mediante la adición de diversos componentes asignados para la etapa del procedimiento específico.

30

35

Para llevar a cabo el procedimiento puede ser ventajoso para la viabilidad de las diferentes etapas del procedimiento concentrar la muestra, por ejemplo, para reducir el volumen sin eliminar ninguna célula. El volumen de la muestra puede reducirse a menos del 80 %, tal como 70, o 60 o 50 % del volumen de la muestra original, o incluso preferible a menos del 40 %, tal como el 25 % del volumen de la muestra original. Una etapa de concentración puede ser la centrifugación. El procedimiento puede comprender de acuerdo con la invención una o más etapas de concentración. La centrifugación es un procedimiento preferido para concentrar las células. Para evitar daños en las células, se prefiere una centrifugación suave, tal como 300 g durante 10 minutos.

40

45

Sedimentación

Las células presentes en la muestra de sangre pueden concentrarse por sedimentación en lugar de centrifugación, donde la mayoría de las células presentes en la muestra pueden sedimentar. La muestra de sangre puede diluirse antes de la sedimentación en una solución adecuada, como NaCl 0,15 M. La sedimentación puede continuar hasta que se haya producido la sedimentación total, tal como, durante al menos 5 horas, o preferentemente durante la noche. Preferentemente, la muestra se deja sedimentar a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, tal como a una temperatura inferior a 15 °C, tal como inferior a 10 °C u 8 °C o 6 °C, preferentemente a una temperatura de 2-8 °C o alrededor de 4 °C.

50

55

Una población menor de células con una densidad baja puede no sedimentar y puede aislarse mediante una fijación previa suave como se describe a continuación, tal como en paraformaldehído al 0,5 % seguido de centrifugación.

60

Fijación

Las células de la muestra de sangre materna se fijan como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en una realización preferida, los eritrocitos maternos se lisan selectivamente inmediatamente después de la fijación.

65

Detección y diagnóstico

Preferentemente, el procedimiento de la invención se usa para la detección y predicción prenatal y/o diagnóstico. Por lo tanto, una célula identificada puede estar sujeta a detección y predicción y/o diagnóstico o una muestra de sangre materna enriquecida para células fetales puede estar sujeta a detección y predicción y/o diagnóstico.

En una realización, las proteínas fetales están disponibles para la detección, por ejemplo, mediante inmunotransferencia, secuenciación de proteínas o espectrometría de masas.

En otra realización preferida, la detección y/o diagnóstico comprenden una etapa para hacer que el ADN o ARN fetal esté disponible para la detección.

Los procedimientos de detección preferidos son FISH (hibridación in situ fluorescente), transferencia Northern, transferencia Southern, secuenciación de ADN/ARN, análisis y amplificación de micromatrices. Dichos procedimientos pueden usarse para detectar la presencia de secuencias específicas que indican una determinada condición, por ejemplo, enfermedad prenatal o predisposición a una determinada enfermedad. Los procedimientos también se pueden usar para detectar una aneuploidía cromosómica tal como la trisomía 13, la trisomía 18 o la trisomía 21. Los procedimientos de detección también se pueden usar para determinar el género del feto mediante la detección de secuencias específicas de Y.

En una realización alternativa, el número de células fetales en la muestra se compara con un número convencional. Un mayor número de células fetales en la muestra puede indicar que el embarazo está en riesgo. El número de células fetales en la muestra (así como en una muestra de control) puede estimarse usando, por ejemplo, FACS.

Identificación de ligandos específicos

En otra realización, una biblioteca de candidatos a ligandos específicos de células fetales puede basarse en ligandos conocidos de células fetales. Dicha biblioteca puede crearse, por ejemplo, mostrando un anticuerpo que se une a las células fetales en un fago y mutagénesis del gen que codifica el anticuerpo para crear una biblioteca. En tal caso, la mutagénesis puede mejorar la especificidad conservando o incluso mejorando la afinidad por las células fetales.

En una realización, el ligando se une a un antígeno codificado por un gen seleccionado del grupo que consiste en tomoregulina, EDN1, AHNAK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, Mouse T, 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 y MMP23A/MMP23B. Así, la afinidad y/o especificidad del ligando se optimizan utilizando el método descrito anteriormente

Ligandos específicos de células fetales y sondas de hibridación

Los ligandos específicos fetales y las sondas de hibridación que pueden utilizarse en el ámbito de la invención reivindicada incluyen

i. un ligando que se une a un antígeno codificado por un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en 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, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGPLD2, 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 y MMP23A/MMP23B

ii. o una sonda de hibridación dirigida a un ácido nucleico que comprende al menos 10 pb de un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en 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, HMG2, ITGA7, KCNK4, KMO, KY, LOC389286, MAD2L1, MAPK3, MYL6, NBR2, NTRK1, PF4, PGK1, PPIA, QPRT, RGPLD2, 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 y MMP23A/MMP23B.

- Más preferentemente, el ligando es un ligando que se une a un antígeno codificado por un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en tomoregulina, EDN1, AHNAK, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, ratón T, 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 y MMP23A/MMP23B, es decir, antígenos expuestos en la superficie. Preferentemente, la kd del ligando para el antígeno elegido es inferior a 10^{-8} M, 10^{-9} y 10^{-10} M. La kd del ligando para cualquier antígeno presente en las células de sangre materna es preferentemente al menos 100 veces más alta e incluso más preferentemente más de 1000 o 10.000 veces más.
- 10 En una realización, el ligando es característico porque permite el 90 % de selección correcta de células en una muestra de prueba que comprende 99,9 % de células maternas y 0,1 % de células fetales. Es decir, cuando se hace referencia a una identificación correcta del 90 %, lo que se entiende en este documento es que cuando se realiza la selección con la muestra de prueba y con el ligando, se recolectarán 90 células fetales por cada 10 células maternas y, análogamente, para una mejor/peor corrección. Un procedimiento de selección preferido es MACS. Más preferido es un ligando que permita una selección correcta del 95 %, una selección correcta del 98 % o incluso una selección de células correcta del 99 % aún más preferida. Dado que una muestra de sangre materna tiene una muy baja abundancia de células fetales, es aún más preferible que el ligando permita una selección de células correcta del 99,9 %, 99,99 % o 99,999 % de una muestra de prueba como se describió anteriormente.
- 15 20 Preferentemente, los ligandos son aptámeros, péptidos o anticuerpos. Los más preferidos son los anticuerpos. Los ligandos se identifican preferentemente para tener una especificidad mejorada.
- 25 Los ligandos o sondas de hibridación pueden ser usadas para enriquecer una muestra de sangre materna para células fetales o para identificar células fetales en una muestra de sangre materna. También se divulga un kit, que per se no forma parte de la invención, que comprende un ligando o una sonda de hibridación como se describe en el presente documento y las instrucciones de uso.
- 30 Preferentemente, el kit comprende un primer ligando para enriquecimiento y un segundo ligando y /o una sonda de hibridación para identificación. El kit puede también comprender un tampón de fijación y un tampón de lisis como se describe.
- 35 Ejemplos
- El ejemplo 1 está escrito en tiempo presente porque describe las etapas metódicas que deben realizarse al enriquecer y/o identificar células fetales a partir de una muestra de sangre materna usando los procedimientos de la invención. La síntesis de ADNc y las micromatrices típicamente no son necesarias para el enriquecimiento y/o la identificación, pero se pueden usar en algunas situaciones. Debe quedar claro que las etapas descritas en el ejemplo 1 se han llevado a cabo realmente para la identificación de los ARNm expresados preferentemente en células fetales a partir de una muestra de sangre materna.
- 40 Ejemplo 1
- Identificación de los ARNm expresados preferentemente en células fetales de una muestra de sangre materna. Fijación, lisis y permeabilización de la sangre materna.
- 50 Las muestras de sangre periférica de 10 a 30 ml se obtienen de mujeres embarazadas de 11 a 14 semanas de edad gestacional. Las muestras de sangre se extraen antes de un procedimiento invasivo y después del consentimiento informado. Todas las muestras de sangre se recogen en tubos heparinizados y se procesan inmediatamente después de recolectarse.
- 55 Además de la sangre de heparina, se extraen 5 ml de sangre en tubos de EDTA. Esta sangre se usa para el análisis de género fetal. El género del feto se establece mediante el análisis del ADN fetal libre. Para cada muestra, se suministran alícuotas de 3 ml de sangre completa en tubos de centrifugación pre-recubiertos de 50 ml (3 a 10 tubos de 50 ml por muestra) con pipetas recubiertas previamente (el tampón de recubrimiento previo es de ASB al 2 % en PBS sin Ca^{2+} , Mg^{2+}). Se añaden dos ml de formaldehído al 10 % en PBS a cada tubo usando pipetas recubiertas previamente. Después de mezclar cuidadosamente, las células sanguíneas se fijan durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 60 Después de la fijación, se añaden 30 ml de Triton X-100 al 0,12 % en PBS (sin Ca^{2+} , Mg^{2+}) a cada tubo. Los tubos se invierten 3 veces y los glóbulos rojos se lisan durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la lisis, se añaden 15 ml de ASB al 2 % en frío (4 °C) en PBS (sin Ca^{2+} , Mg^{2+}) a cada tubo. Después de
- 65

ES 2 985 983 T3

mezclar invirtiendo los tubos 2 veces, las células no lisadas se sedimentan mediante centrifugación a 500 g durante 15 minutos a 4 °C. Después de eliminar el sobrenadante, las células se vuelven a suspender en 10 ml de PBS frío a 4 °C sin Ca²⁺, Mg²⁺ y las muestras se almacenan a 4 °C durante la noche.

5 Solo se analizan más las muestras de sangre de mujeres embarazadas con un feto masculino. Estas muestras se permeabilizan añadiendo 10 ml de metanol frío (-20 °C) al almacén de suspensión celular de 10 ml durante la noche, y las células se permeabilizan durante 10 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación a 500 g durante 10 minutos, los sedimentos celulares se agrupan en un tubo con pipetas recubiertas previamente. Los tubos vacíos se enjuagan con 1 ml de PBS, ASB al 0,5 %, EDTA 2 mM. Las células agrupadas se transfieren luego a un tubo de 15 ml y se centrifugan a 500 g durante 10 minutos y se vuelven a suspender en lo que corresponde a 40 µl de PBS que contiene ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM por 1 ml de sangre completa, y las células se manchan en portaobjetos recubiertos con polilisina (4 µl cada uno). Se hacen un total de 60 portaobjetos de cada muestra de sangre masculina. Después de secar al aire los portaobjetos se sellan individualmente en bolsas de plástico herméticas y se almacenan a -20 °C hasta un análisis adicional.

15 Identificación de células fetales masculinas mediante FISH de color inverso y escaneo automatizado. Los portaobjetos se recuperan del congelador y las bolsas de plástico herméticas se retiran. Antes de la hibridación, los portaobjetos se enjuagan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y, durante 5 minutos antes, se deshidratan 3 minutos cada uno en etanol al 60 %, 80 % y 99,9 % y se secan al aire.

20 Para la primera hibridación se usan sondas de repetición específicas de cromosoma, DXZ1 marcadas con espectro verde y DYZ1 marcadas con espectro naranja (Abbott Molecular). La mezcla de hibridación que contiene ambas sondas se prepara mezclando 1 parte de la sonda X, 1 parte de la sonda Y, 1 parte de agua destilada y 7 partes de tampón de hibridación (Vysis). Para FISH de portaobjetos completo, se añaden 28 µl de la mezcla de hibridación y se cubren con un cubreobjetos de 22 x 50 mm. Los cubreobjetos se sellan con cemento de caucho y los ADN se desnaturalizan en una placa caliente a 83,5 °C durante 7 minutos y se hibridan durante la noche en una atmósfera humidificada a 42 °C.

30 Al día siguiente, los portaobjetos hibridados se lavan durante 2 minutos en 0,4 x SSC/Tween 20 al 0,3 % a 73 °C y durante 1 minuto en 2 x SSC/Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente. Luego se montan los portaobjetos en Vectashield con 1,5 µg/ml de DAPI como tinción contraria.

35 Las células que contienen una señal roja ubicada en un núcleo teñido con DAPI se identifican mediante escaneo automático usando dos tipos diferentes de escáneres. El sistema de escaneo de portaobjetos MDS (versión 5.8.0) desarrollado originalmente por Applied Imaging, y el sistema de escaneo MetaCyte desarrollado por MetaSystems. Con el sistema de escaneo MDS, los portaobjetos se escanean con un aumento de 20 usando la función de escaneo 5. Con los portaobjetos MetaCyte se escanean con un aumento de 10 usando un clasificador optimizado internamente para detectar señales de FISH de espectro naranja verdaderas. Después del escaneo, las células identificadas por el escáner se inspeccionan visualmente mediante reubicación automática. Las células que tienen una señal roja pero dos señales X verdes se descartan, mientras que las células que tienen una señal roja y una señal X verde o una señal X verde dividida se clasifican como células fetales masculinas candidatas.

45 El verdadero origen fetal de las células fetales candidatas se analiza mediante la re-hibridación de células candidatas con las mismas sondas X e Y en colores inversos. En primer lugar, los cubreobjetos se eliminan incubando los portaobjetos en 4xSSC/Tween 20 0,1 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se lavan luego en 2xSSC durante 5 minutos, se deshidratan con etanol al 60 %, 80 % y 99,9 % y se secan al aire. La mezcla de hibridación que contiene 1 parte de las sondas de repetición específicas del cromosoma, DXZ1 marcado con espectro rojo, 1 parte de la sonda de repetición específica del cromosoma DYZ1 marcado con espectro verde, 1 parte de agua destilada y 7 partes de tampón de hibridación se usa para la re-hibridación. Para FISH de portaobjetos completo, se añaden 28 µl de la mezcla de hibridación y se cubren con un cubreobjetos de 22 x 50 mm. Para el FISH selectivo, se aplican 2,5 µl de mezcla de hibridación en las posiciones de los portaobjetos donde se encontraron las células fetales candidatas y la mezcla se extiende cubriéndola con un cubreobjetos circular de 10 mm. Los cubreobjetos se sellan luego con cemento de caucho y los ADN se desnaturalizan en una placa caliente a 83,5 °C durante 7 minutos y se hibridan durante la noche en una atmósfera humidificada a 42 °C.

60 Después de la re-hibridación, los portaobjetos se lavan durante 2 minutos en 0,4 x SSC/Tween 20 al 0,3 % a 73 °C y durante 1 minuto en 2 x SSC/Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente. Los portaobjetos se montan en Vectashield que contiene DAPI.

65 Los portaobjetos re-hibridados se colocan en el microscopio de escaneo y las células fetales candidatas se reubican y las señales de FISH se analizan visualmente. Las células fetales candidatas que se vuelven a hibridar cuando la señal roja permanece roja y la señal verde cambia a rojo se clasifican como células fetales falsas (<5 %), mientras que las células fetales candidatas que se vuelven a hibridar cuando la señal roja cambia a verde y la señal verde a rojo se clasifican como células fetales verdaderas (> 95 %).

PALM

5 Cuando se han detectado 23 células fetales mediante re-hibridación, las posiciones exactas (coordenadas) de las células fetales individuales en los portaobjetos del microscopio se determinan mediante el uso de un Englanfinder, por lo que las células fetales se pueden encontrar en otros microscopios.

10 Las células fetales se extraen de los portaobjetos del microscopio usando la tecnología de microdissección láser y catapulta a presión (LMPC) en un sistema de microscopio PALM MicroBeam de Carl Zeiss. Los portaobjetos de microscopio que contienen células fetales se transportan a Carl Zeiss MicroImaging GmbH, (ubicado en Múnich, Alemania), donde las células fetales se vuelven a encontrar usando sus coordenadas específicas en el Englanfinder. Los cubreobjetos se retiran cuidadosamente después de remojar los portaobjetos en PBS durante 10-15 minutos. Los portaobjetos se enjuagan luego durante 10 minutos en PBS antes de deshidratarse cada 3 minutos en etanol al 60 %, 80 % y 99,9 % y se secan al aire. A continuación, las células fetales se extraen del portaobjetos en una tapa adhesiva de un tubo del tamaño de RCP mediante catapultación con láser usando un microscopio PALM MicroBeam. Las 23 células fetales se recolectan en la misma tapa. En otra tapa, se recolectan células de control maternas: de cada portaobjetos que contiene una célula fetal, 100 células maternas circundantes se recolectan en la tapa de control, lo que da un número total de 2300 células de control maternas. Los dos tubos que contienen células fetales y células de control en sus tapas, respectivamente, se 20 envían a Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania, para un análisis detallado.

El ARN de la muestra fetal y la muestra de control es amplificado por Miltenyi Biotec por su servicio SuperAmp como se describe en su página de inicio. El ADNc amplificado se usa para hacer dos tipos diferentes de micromatrices: micromatriz de genoma completo de Agilent y micromatriz de células madre PIQOR™, como se describe en la página principal de Miltenyi Biotec. 25

De los resultados de la micromatriz, primero se seleccionan 61 genes (enumerados en la tabla 1) como posibles candidatos para marcadores de células fetales. Se seleccionan en función de tres criterios diferentes: se seleccionan 41 genes porque tienen 2 o más sondas diferentes en la matriz que muestran señales fuertes en la matriz del genoma completo de Agilent fetal y señales no o muy débiles en la matriz del genoma completo de Agilent materno. Se seleccionan 10 genes debido a señales muy fuertes en la matriz del genoma completo de Agilent fetal. Los últimos 10 genes se seleccionan porque, tanto en las matrices del genoma completo de Agilent como en la matriz de células madre PIQOR™, muestran señales en la matriz fetal (Agilent)/canal (micromatriz de células madre PIQOR™), pero no en la matriz/canal materno. Los 61 genes se estudian exhaustivamente en la bibliografía y, sobre la base de esto, se seleccionan 9 genes como candidatos a marcadores de células fetales expuestas en la superficie celular: EDN1, AHNAK, tomoregulina, CD 105, SYT 9, KMO, HMGA1, ratón T, ACVR2B. 30 35

Tabla 1:

40

Nombre del gen	Nombre sistemático	Descripción	Señal materna	Señal fetal
ZNF614	NM_025040	Proteína de dedo de zinc 614 (ZNF614) de homo sapiens, ARNm [NM_025040]	2,50	52,61
ZNF539	NM_203282	Proteína de dedo de zinc 539 (ZNF539) de homo sapiens, ARNm [NM_203282]	1,66	20,81
ZNF283	AK098175	ADNc de homo sapiens FLJ40856 fis, clon TRACH2016498, moderadamente similar a PROTEÍNA DE DEDO DE ZINC 184. [AK098175]	1,21	773,52
ZFYVE9	NM_004799	Dedo de zinc de homo sapiens, dominio FYVE que contiene 9 (ZFYVE9), variante de transcripción 3, ARNm [NM_004799]	1,86	785,02
WRN	NM_000553	Síndrome Werner de homo sapiens (WRN), ARNm [NM_000553]	0,86	13,39
UBL4A	NM_014235	4A similar a ubiquitina de homo sapiens (UBL4A), ARNm [NM_014235]	0,87	80,27
TPM3	NM_153649	Tropomiosina 3 de homo sapiens (TPM3), variante de transcripción 2, ARNm [NM_153649]	1,03	25,86
TP73	NM_005427	Proteína p73 de tumor de homo sapiens (TP73), ARNm [NM_005427]	0,89	14,53
TMEFF2	AB004064	ARNm de homo sapiens para tomoregulina, cds completos.	2,73	899,23

ES 2 985 983 T3

Nombre del gen	Nombre sistemático	Descripción	Señal materna	Señal fetal
		[AB004064]		
THC2274391	THC2274391	RIFK_HUMAN (Q969G6) Riboflavina quinasa (ATP: riboflavina 5'-fosfotransferasa) (Flavocinasa), completa [THC2274391]	0,87	893,63
THC2265980	THC2265980	T97996 ye56c04.s1 Soares bazo de hígado fetal 1NFLS clon de ADNc de homo sapiens IMAGEN: 121734 3 'similar a SP: RL2B_RAT P29316 60S PROTEÍNA RIBOSÓMICA;, ARNm secuencia [T97996]	0,92	62,58
T(BRACHYURY)	NM_003181	Homólogo de brachyury T (ratón) (T) de homo sapiens, ARNm [NM_003181]	5,38	44,45
SYT9	NM_175733	Sinaptotagmina IX de homo sapiens (SYT9), ARNm [NM_175733]	0,89	1567,50
SLAMF1	NM_003037	Miembro de la familia de la molécula de activación linfocítica 1 de señalización de homo sapiens (SLAMF1), ARNm [NM_003037]	1,05	62,58
RPS27	NM_001030	Proteína ribosomal S27 de homo sapiens (metalopantostimulina 1) (RPS27), ARNm [NM_001030]	0,90	639,19
RPL39	NM_001000	Proteína ribosomal L39 de homo sapiens (RPL39), ARNm [NM_001000]	0,87	869,05
RPL26	NM_000987	Proteína ribosomal L26 de homo sapiens (RPL26), ARNm [NM_000987]	0,92	313,51
RPL23A	NM_000984	Proteína ribosomal L23a de homo sapiens (RPL23A), ARNm [NM_000984]	0,91	25,80
RPL23	NM_000978	Proteína ribosomal L23 de homo sapiens (RPL23), ARNm [NM_000978]	2,28	943,60
RP11-78J21.1	NM_001011724	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea tipo A1 de homo sapiens (LOC144983), variante de transcripción 1, ARNm [NM_001011724]	0,89	52,05
RGPD2	NM_001024457	Dominio GRIP que contiene 2 y similar a RANBP2 de homo sapiens (RGPD2), ARNm [NM_001024457]	2,19	715,07
QPRT	NM_014298	Quinolinato fosforribosiltransferasa (nicotinato-nucleótido pirofosforilasa (carboxilación)) de homo sapiens (QPRT), ARNm [NM_014298]	1,95	214,40
PPIA	NM_203430	Peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina A) de homosapiens (PPIA), variante de transcripción 2, ARNm [NM_203430]	0,88	230,29
PGK1	NM_000291	Fosfoglicerato quinasa 1 de homo sapiens (PGK1), ARNm [NM_000291]	0,93	22,71
PF4	NM_002619	Factor 4 de plaquetas de homo sapiens (quimiocina (motivo CXC) ligando 4) (PF4), ARNm [NM_002619]	0,97	8,48
NTRK1	NM_002529	Tirosina quinasa neurotrófica de homo sapiens, receptor, tipo 1 (NTRK1), variante de transcripción 2, ARNm [NM_002529]	2,77	10,84
NBR2	NM_005821	Vecino de homo sapiens del gen 2 de BRCA1 (NBR2), ARNm [NM_005821]	0,99	247,30
MYL6	NM_079423	Miosina de homo sapiens, polipéptido ligero 6, álcali, músculo liso y no muscular (MYL6), variante de transcripción 2, ARNm [NM_079423]	2,19	4314,15
MAPK3	NM_002746	Proteína quinasa 3 activada por mitógeno de homo sapiens (MAPK3), variante de transcripción 1, ARNm [NM_002746]	1,22	10,99

ES 2 985 983 T3

Nombre del gen	Nombre sistemático	Descripción	Señal materna	Señal fetal
MAD2L1	NM_002358	MAD2 deficiente de detección mitótica tipo 1 de homo sapiens (levadura) (MAD2L1), ARNm [NM_002358]	0,96	9,16
LOC389286	NM_001018022	Similares a FKSG62 de homosapiens (LOC389286), ARNm [NM_001018022]	0,89	378,70
KY	NM_178554	Cifoescoliosis peptidasa de homo sapiens (KY), ARNm [NM_178554]	0,95	868,36
KMO	NM_003679	Cinurenina 3-monooxigenasa de homo sapiens (cinurenina3-hidroxilasa) (KMO), ARNm [NM_003679]	0,88	163,00
KCNK4	NM_033310	Canal de potasio de homo sapiens, subfamilia K, miembro 4 (KCNK4), ARNm [NM_033310]	12,21	204,06
ITGA7	NM_002206	Integrina de homo Sapiens, alfa 7 (ITGA7), ARNm [NM_002206]	0,92	10,02
HMG2	NM_005517	Dominio de unión nucleosomal 2 grupo de alta movilidad de homo sapiens (HMG2), ARNm [NM_005517]	2,16	22,05
HMGA1	NM_002131	Grupo de alta movilidad AT-hook 1 de homo sapiens (HMGA1), variante de transcripción 2, ARNm [NM_002131]	1,81	74,66
HLA-C	BC002463	Complejo de histocompatibilidad mayor de homo sapiens, clase I, C, ARNm (clon de ADNc MGC: 2285 IMAGEN: 3345005), cds completos. [BC002463]	0,98	40,27
HIST1H2AJ	NM_021066	Histona 1 H2aj de homo sapiens (HIST1H2AJ), ARNm [NM_021066]	2,97	49,45
GSK3A	NM_019884	Glucógeno sintasa quinasa 3 alfa de homo sapiens (GSK3A), ARNm [NM_019884]	2,81	1780,97
GCC2	NM_181453	Dominio GRIP y de bucles superenrollados de homo sapiens que contiene 2 (GCC2), variante de transcripción 1, ARNm [NM_181453]	2,80	831,61
FYN	NM_002037	Oncogen FYN de homo sapiens relacionado con SRC, FGR, YES (FYN), variante de transcripción 1, ARNm [NM_002037]	0,90	28,36
FLJ35740	NM_147195	Proteína FLJ35740 de homo sapiens (FLJ35740), ARNm [NM_147195]	0,99	15,22
ENST00000356196	ENST00000356196	PREVISTA: Similar a la proteína ribosomal de homo sapiens L26 60S (proteína del gen 20 inducida por sílice) (SIG-20) (LOC400055), ARNm [XM_374987]	2,23	940,84
EEF1A1	NM_001402	Factor de alargamiento de la traducción eucariótica de homo sapiens 1 alfa 1 (EEF1A1), ARNm [NM_001402]	1,29	160,32
EDN1	NM_001955	Endotelina 1 de homo sapiens (EDN1), ARNm [NM_001955]	0,89	404,58
DKFZp434F142	AL136837	ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp434F142 (del clon DKFZp434F142). [AL136837]	2,53	310,56
D4ST1	NM_130468	Dermatán 4 sulfotransferasa 1 de homo sapiens (D4ST1), ARNm [NM_130468]	1,79	25,13
CRYL1	NM_015974	Cristalina de homo sapiens, lambda 1 (CRYL1), ARNm [NM_015974]	1,93	15,35
CPS1	NM_001875	Carbamoil-fosfato sintetasa 1 de homo sapiens, mitocondrial (CPS1), ARNm [NM_001875]	0,91	35,55
CD7	NM_006137	Molécula CD7 de homo sapiens (CD7), ARNm [NM_006137]	20,39	145,67
CCNA2	NM_001237	Ciclina A2 de homo sapiens (CCNA2),	0,88	52,42

ES 2 985 983 T3

Nombre del gen	Nombre sistemático	Descripción	Señal materna	Señal fetal
		ARNm [NM_001237]		
CB123670	CB123670	K-EST0172083 L12JSHC0 clon de ADNc de homo sapiens L12JSHC0-2-D12 5', secuencia de ARNm [CB123670]	1,53	812,97
BC111482	BC111482	Clon de ADNc de homo sapiens IMAGEN: 5743861, con aparente intrón conservado. [BC111482]	0,88	51,28
BC089454	BC089454	Clon de ADNc de homo sapiens MGC: 105145 IMAGEN: 30563285, cds completos. [BC089454]	0,84	51,55
ALS2CL	NM_147129	tipo ALS2 C-terminal (ALS2CL) de homo sapiens, variante de transcripción 1, ARNm [NM_147129]	2,96	14,83
AK000420	AK000420	ADNc FLJ20413 fis de tipo homo sapiens, clon KAT02170. [AK000420]	0,91	113,52
AHNAK	NM_001620	Nucleoproteína AHNAK (desmoyequina) de homo sapiens (AHNAK), variante de transcripción 1, ARNm [NM_001620]	2,53	1672,13
ADAM11	NM_002390	Dominio ADAM metalopeptidasa 11 de homo sapiens (ADAM11), ARNm [NM_002390]	0,99	21,49
ACVR2B	NM_001106	Receptor de activina A de homo sapiens, tipo IIB (ACVR2B), ARNm [NM_001106]	5,13	39,23
ABHD2	NM_007011	Dominio abhidrolasa que contiene 2 de homo sapiens (ABHD2), variante de transcripción 1, ARNm [NM_007011]	0,96	21,99

Ejemplo 2

Identificación de células fetales a partir de una muestra de sangre materna usando ligandos.

5

Agotamiento de células maternas CD45 y GPA positivas.

Las muestras de sangre materna usadas para la identificación de células fetales usando ligandos específicos de células fetales se procesan como se describe en el ejemplo 1. Después de la centrifugación final a 500 g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y el sedimento celular se vuelve a suspender en 80 µl por 107 células de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM usando una micro punta recubierta previamente. Se añadieron 20 µl de microperlas CD45 y 40 µl de microperlas de GPA. Después de mezclar usando una micro punta pre-recubierta, las células se incuban durante 15 minutos a 4 °C. Las células se lavan añadiendo 5 ml de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM y se centrifugan a 500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se elimina y el sedimento celular se vuelve a suspender en 2 ml de PBS con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM usando una punta de pipeta recubierta previamente. La suspensión de células se carga en una columna LD prelavada y el flujo se recoge en un tubo recién recubierto. Una vez que la suspensión celular ha atravesado, la columna se lava 3 veces con 1 ml de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM. El tubo que contiene el flujo se centrifuga luego a 500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha y el sedimento celular se vuelve a suspender en 400-600 µl (si se trata de 24 ml de sangre) PBS con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM usando puntas de pipeta recubiertas previamente y las células se colocan en portaobjetos recubiertos con polilisina y los portaobjetos se secan al aire durante la noche. Una muestra de sangre de 24 ml normalmente proporciona de 10 a 15 portaobjetos con un área de frotis de células de 15 x 15 mm por portaobjeto.

25

Identificación de células fetales.

Las células fetales se identifican usando un anticuerpo contra el producto de uno de los genes expresados preferentemente en células fetales como, por ejemplo, la sinaptotagmina IX, que es el producto de SYT9.

30

Después del secado al aire, los portaobjetos se rehidratan en 4xSSC durante 5 minutos, luego se incuban previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl de tampón de bloqueo que consiste en 4xSSC que contiene ASB al 1 % y reactivo de bloqueo al 0,5 % (Roche). A continuación, los portaobjetos se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl de solución de anticuerpo primario biotinilado diluida en tampón de bloqueo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la incubación del anticuerpo, los portaobjetos se lavan tres veces durante 5 minutos en 4xSSC. Para detectar anticuerpos unidos a células fetales, los portaobjetos se incuban con 100 µl de estreptavidina conjugada con FITC diluida 1:100 en tampón de bloqueo durante 30 minutos a TA. Después de lavar dos veces durante 5 minutos cada uno en 4xSSC y una vez durante 5 minutos en 2xSSC, los portaobjetos se montaron en Vectashield que contenía 1,5

35

µg de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para contrarrestar el núcleo.

5 Las células fetales teñidas con anticuerpos se identifican mediante escaneo automático usando el programa Metafer desarrollado por Metasystems. Los portaobjetos se escanean con un aumento de 10 usando un clasificador desarrollado en la empresa optimizado para detectar células teñidas con sinaptotagmina. El verdadero origen fetal de las células teñidas con anticuerpos se puede confirmar con XY FISH como se describe en el ejemplo 1.

10 Ejemplo 3

Enriquecimiento de células fetales a partir de una muestra de sangre materna

Marcado de anticuerpos.

15 Las muestras de sangre materna usadas para el enriquecimiento de células fetales usando un ligando específico de células fetales se procesan como se describe en el ejemplo 1. Después de la centrifugación final a 500 g durante 10 minutos, el sobrenadante se descarta y el sedimento celular se vuelve a suspender en 95 µl de PBS frío con ABS al 0,5 % y EDTA 2 mM por 10⁷células. Se añaden 5 µl por 10⁷células de anticuerpo TMEFF biotinilado usando puntas de pipetas recubiertas previamente. Después de mezclar, las células se
20 incuban durante 30 a 60 minutos a 4 °C o a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se lavan añadiendo 5 ml de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 500 g, el sobrenadante se desecha y el sedimento celular se vuelve a suspender en 80 µl de PBS frío con ABS al 0,5 % y EDTA 2 mM por 10⁷células. Se añaden 20 µl de microperlas antibiotina por 10⁷células usando una punta de pipeta recubierta previamente. Después de mezclar, las células se incuban durante 30
25 minutos a 40 °C. Las células se lavan de nuevo añadiendo 5 ml de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 500 g, el sobrenadante se desecha y el sedimento celular se vuelve a suspender en 5 ml de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM.

30 Selección positiva usando MACS

Una columna LD prelavada y una columna MS prelavada se colocan en los imanes, apilados. La suspensión de células marcadas se aplica a la columna LD superior. Cuando las células han atravesado la columna LD, se lavan dos veces con 2 ml de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM. La columna LD se retira del imán y se coloca en un tubo de centrifugación de 15 ml recién recubierto. Las células se eluyen aplicando 2 veces 5
35 ml de PBS frío con ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM. Los primeros 5 ml de tampón atraviesan la columna sin aplicar el émbolo. Los segundos 5 ml de tampón atraviesan la columna aplicando el émbolo. La columna MS se retira luego del imán y se coloca en el tubo de recogida. Las células se eluyen de la misma manera que para la columna LD usando 2 veces 1 ml de tampón frío en lugar de 2 x 5 ml. El tubo de recogida se centrifuga durante 10 minutos a 500 g. El sobrenadante se desecha y el sedimento celular se vuelve a suspender en PBS frío con
40 ASB al 0,5 % y EDTA 2 mM. La suspensión celular se coloca luego en un portaobjetos recubierto con polilisina, y el portaobjetos se seca al aire antes de un análisis adicional.

Detección de células fetales masculinas

45 Las células fetales masculinas aisladas usando el anticuerpo TMEFF se identifican mediante FISH XY seguido de escaneo automático y validación manual como se describe en el ejemplo 1. El origen fetal de las células candidatas fetales se confirma mediante FISH de color inverso como se describe en el ejemplo 1.

50 Ejemplo 4

Análisis cromosómica de células fetales de sangre materna

El análisis para el síndrome de Down en células fetales de sangre materna se realiza mediante FISH usando el LSI 21 de Abbott Molecular. Antes de FISH, el cubreobjetos se lava con una incubación de 10 minutos en
55 2xSSC. El portaobjetos se enjuaga luego en PBS y se deshidrata en concentraciones crecientes de etanol. Después del secado al aire, se aplican 10 µl de la mezcla de la sonda en la posición del portaobjetos donde se ubican las células fetales y la mezcla se extiende cubriendo el área con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. A continuación, el cubreobjetos se sella con cemento de caucho y los ADN se desnaturalizan en una placa caliente durante 7 minutos a 83,5 °C, y se hibridan durante la noche en una atmósfera humidificada a 37 °C. Al día siguiente, los portaobjetos hibridados se lavan a 73 °C durante 2 minutos en 0,4 x SSC con Tween 20 al
60 0,3 %, seguido de 1 minuto en 2 x SSC con Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente. Los portaobjetos se montan en Vectashield que contiene 1,5 µg/ml de DAPI como contratinción. Los números de las señales de FISH del cromosoma 21 presentes en las células fetales se cuentan en el microscopio reubicándose en las células específicas usando el archivo de escaneo original.

65

Ejemplo 5

ES 2 985 983 T3

Identificación de los ARNm expresados preferentemente en células fetales de una muestra de sangre materna, enriquecida con la selección positiva para CD105.

- 5 Las muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas se fijan, los glóbulos rojos se lisan y los glóbulos blancos se permeabilizan como se describe en el ejemplo 1.

10 A 500 µl de suspensión celular se añadieron 130 µl de microperlas CD105 (Miltenyi) y la suspensión celular se incubó durante 60 minutos a 4 °C. Las células se lavaron luego añadiendo 6 ml de tampón MACS frío seguido de una centrifugación durante 10 minutos a 500 g. El sobrenadante se eliminó y las células se volvieron a suspender en 2 ml de tampón MACS frío.

15 La suspensión celular marcada con CD105 se aplicó a una columna MS prelavada (Miltenyi) ya situada en el imán y se apiló encima de una columna MS prelavada (Miltenyi). Cuando las células atravesaron la columna LD, se lavaron dos veces con 2 ml de tampón MACS frío. La columna MS se lavó con 1 ml de tampón MACS frío. Luego se retiró luego la columna LD del imán, se colocó en un tubo de 15 ml recubierto previamente, y las células se eluyeron aplicando 2 veces 5 ml de tampón MACS frío. Los primeros 5 ml de tampón atravesaron la columna sin aplicar un émbolo. Los segundos 5 ml de tampón se forzaron a través de la columna aplicando un émbolo. La columna MS se retiró entonces del imán y se colocó en el tubo de recogida. Las células se eluyeron de la misma manera que para la columna LD usando 2 veces 1 ml de tampón MACS frío en lugar de 2 veces 5 ml de tampón. El tubo de recogida se centrifugó a 500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se volvió a suspender en tampón MACS frío. La suspensión celular se colocó luego sobre portaobjetos recubiertos con poli-lisina, y los portaobjetos se secaron al aire (durante la noche) antes de un análisis adicional.

25 Las células fetales masculinas se identificaron mediante FISH específico para los cromosomas X e Y escaneo automático. Antes de la hibridación, los portaobjetos se enjuagaron en PBS durante 5 minutos y se deshidrataron durante 3 minutos cada uno en etanol al 60 %, 80 % y 99,9 %. Para este análisis, se usó el ADN satélite CEP X alfa de la sonda de repetición DXZ1 específico para el cromosoma marcado con el espectro verde y el satélite III CEP Y de la sonda DYZ1 marcado con el espectro naranja (Abbott Molecular). Las mezclas de hibridación que contenían ambas sondas se prepararon mezclando 1 parte de la sonda X, 1 parte de la sonda Y, 1 parte de agua destilada y 7 partes de tampón de hibridación. Se añadieron quince µl de mezcla de hibridación y se cubrieron con un cubreobjetos de 24 x 24 mm. Los cubreobjetos se sellaron con cemento de caucho y los ADN se desnaturalizaron en una placa caliente a 83,5 °C durante 7 minutos y se hibridó durante 30 de la noche en una atmósfera humidificada a 42 °C. Los portaobjetos hibridados se lavaron durante 2 minutos a 73 °C en 0,4 x SSC con Tween 20 al 0,3 % y durante 1 minuto a temperatura ambiente en 2xSSC con Tween 35 al 0,1 %. Los portaobjetos se montaron luego en Vectashield con DAPI.

40 Las células que contenían una señal de FISH roja localizada en un núcleo teñido con DAPI se identificaron mediante escaneo automático usando dos tipos diferentes de escáneres. El sistema de escaneo de portaobjetos MDS (versión 5.8.0) desarrollado originalmente por Applied Imaging, y el sistema de escaneo MetaCyte desarrollado por MetaSystems. Con el sistema de escaneo MDS, los portaobjetos se escanearon con un aumento de 20 usando la función de escaneo 5. Con MetaCyte, los portaobjetos se escanearon con un aumento de 10 usando un clasificador desarrollado y optimizado internamente para la detección de señales de FISH de verdadero espectro naranja. Después del escaneo, las células identificadas por el escáner se inspeccionaron visualmente mediante reubicación automática. Las células que tenían una señal X verde y una señal Y naranja significativamente mayor que la señal X se clasificaron como células fetales masculinas.

50 Se aíslan dos veces 98 células fetales CD105 positivas masculinas identificadas por un FISH XY y dos veces 980 células maternas circundantes mediante microdissección láser y catapulta a presión como se describe en el ejemplo 1. El ARN de las dos muestras fetales y las dos muestras de control se amplifican por Miltenyi Biotec por su Servicio SuperAmp, y los ADNc amplificados se usan para hacer dos micromatrices de células madre PIQOR™ (réplica biológica), como se describe en el ejemplo 1.

55 De los resultados de la micromatriz PIQOR, se seleccionan 24 genes adicionales (tabla 2) sobre la base de 3 criterios diferentes. Primero, el gen debe mostrar una relación de señal fetal/materna alta o relativamente alta en ambas matrices PIQOR fabricadas de células fetales positivas para CD105 que se hibridaron una vez (la réplica biológica). Además, el gen debe mostrar una relación de señal fetal/materna alta o relativamente alta en al menos uno de las dos matrices PIQOR fabricadas de las 23 células fetales no enriquecidas que se hibridan dos veces (la réplica técnica). Finalmente, el gen debe mostrar una expresión muy baja o nula en 60 sangre completa.

Tabla 2

ES 2 985 983 T3

Símbolo del gen	Número de acceso	Definición	Relación: señal fetal/señal materna (matrices PIQOR)
THBD (CD141)	NM_000361	Trombomodulina de homo sapiens (THBD), ARNm.	2,06/33 % 1,92/36 % 0,97/52 % 1,87/47 %
FLT3 (CD135)	NM_004119	Tirosina quinasa 3 relacionada con fms de homo sapiens (FLT3), ARNm.	2,32/30 % 1,83/11 % 1,92/58 % 2,00/21 %
F3 (CD141)	NM_001993	Factor de coagulación III de homo sapiens (tromboplastina, factor tisular) (F3), ARNm.	2,66/46 % 2,10/25 % 1,87/60 % 1,87/14 %
MCAM (CD146)	NM_006500	Molécula de adhesión celular de melanoma de homo sapiens (MCAM), ARNm.	4,23/20 % 2,94/17 % 2,60/48 % 3,07/29 %
CD33	NM_001772	Molécula CD33 de homo sapiens (CD33), variante de transcripción 1, ARNm.	5,38/7 % 4,07/9 % 8,57/38 % 7,69/50 %
CD68	NM_001040059 NM_001251	Molécula CD68 de homo sapiens (CD68), variante de transcripción 1 y variante de transcripción 2, ARNm.	2,42/37 % 2,19/16 % 2,35/31 % 2,00/34 %
CDH5 (CD144)	NM_001795	Cadherina 5 de homo sapiens, tipo 2 (endotelio vascular) (CDH5), ARNm.	0,69/- % 0,71/- % 1,84/36 % 2,00/104 %
SELE (CD62E)	NM_000450	Selectina E de homo sapiens (SELE), ARNm.	1,43/16 % 2,11/24 % 3,51/53 % 2,98/27 %
GJA5 (GAP)	NM_181703	Proteína de unión comunicante de homo sapiens, alfa 5, 40 kDa (GJA5), variante de transcripción B, ARNm.	1,95/45 % 1,82/21 % 0,97/49 % 1,24/39 %
ITGA5	NM_002205	Integrina de homo sapiens, alfa 5 (receptor de fibronectina, polipéptido alfa) (ITGA5), ARNm.	3,25/33 % 2,51/17 % 1,88/53 % 2,25/56 %
KCNK3 (TASK-1)	NM_002246	Canal de potasio de homo sapiens, subfamilia K, miembro 3 (KCNK3), ARNm.	2,04/37 % 1,90/28 % 1,73/40 %
CNTFR	NM_001842 NM_147164	Receptor del factor neurotrófico ciliar de homo sapiens (CNTFR), variante de transcripción 1 y variante de transcripción 2, ARNm.	3,31/28 % 2,62/- % 3,49/53 %
F11R (JAM-1)	NM_016946	Receptor F11 de homo sapiens (F11R), ARNm.	4,43/30 % 3,56/22 % 2,52/3 % 3,32/55 %
SDC4 (Sindecano 4)	NM_002999	Sindecano 4 de homo sapiens (SDC4), ARNm.	2,01/11 % 1,73/40 % 2,19/19 %
ACVR2B	NM_001106	Receptor de activina A de homo sapiens, tipo IIB (ACVR2B), ARNm.	1,90/0 % 1,48/9 % 1,39/41 % 1,74/27 %
ACVR2A	NM_001616	Receptor de activina A de homo sapiens, tipo IIA (ACVR2A), ARNm.	1,30/17 % 2,08/23 % 2,60/44 % 1,76/30 %

ES 2 985 983 T3

Símbolo del gen	Número de acceso	Definición	Relación: señal fetal/señal materna (matrices PIQOR)
CD44 (CD44v6+ CD44v4/5)	NM_000610 NM_001001389	Molécula CD44 de homo sapiens (grupo sanguíneo indio) (CD44), variante de transcripción 1 y variante de transcripción 2, ARNm.	1,30/24 % 3,23/77% 7,09/75 % 1,96/48 %
STX1A	NM_004603	Sintaxina 1A de homo sapiens (cerebro) (STX1A), ARNm.	5,09/26 % 4,23/62% 4,80/55%
TEK (Tie2)	NM_000459	Tirosina endotelial TEK de homo sapiens (TEK), ARNm.	2,13/31 % 2,23/55 % 2,37/65 %
L1CAM (CD171)	NM_000425 NM_024003	Molécula de adhesión celular L1 de homo sapiens (L1CAM), variante de transcripción 1 y variante de transcripción 2, ARNm.	1,98/35 % 2,37/22 % 2,37/61 % 2,18/28 %
NCAM1 (CD56)	NM_000615 NM_001076682 NM_181351	Molécula de adhesión celular neural 1 de homo sapiens (NCAM1), variante de transcripción 1, variante de transcripción 2 y variante de transcripción 3, ARNm.	0,90/- % 1,60/17 % 3,83/54 % 2,10/27 %
ALPP	NM_001632	Fosfatasa alcalina de homo sapiens, placentaria (isozima de Regan) (ALPP), ARNm	1,63/- % 1,83/13 % 3,10/52 % 1,70/93%
ALPPL2	NM_031313	Fosfatasa alcalina de homo sapiens, placentaria 2 (ALPPL2), ARNm.	1,16/82 % 5,46/44 % 7,91/22 % 2,26/61 %
MMP23B (y MMP23A)	NM_006983 NR_002946	Matriz metalopeptidasa 23B de homo sapiens (MMP23B), ARNm. Matriz metalopeptidasa 23A de homo sapiens (pseudogen) (MMP23A), ARN no codificante.	0,86/52 % 1,11/56% 2,80/67 % 2,05/54 %

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de una célula fetal que comprende las etapas de
 - 5 a. proporcionar una muestra de sangre materna o una fracción de la misma
 - b. fijar las células de la muestra de sangre materna o de su fracción,
 - 10 c. lisar selectivamente los eritrocitos, y
 - d. poner en contacto las células fijadas resultantes de la etapa c con un ligando dirigido a un antígeno codificado por un gen CD105 expresado diferencialmente en células fetales de una muestra de sangre materna.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de enriquecimiento dependiente del ligando o de la sonda de hibridación de las células fetales de la muestra.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, donde la identificación comprende detectar la presencia del ligando en o sobre las células fetales.
- 20 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, donde el enriquecimiento comprende poner en contacto la muestra de sangre materna con un ligando dirigido a un antígeno expuesto en la superficie celular codificado por un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en 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, 25 ALPPL2 y MMP23A/MMP23B.