

(12) Oversættelse af
europæisk patentskrift

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl. ⁸: **C 12 Q 1/68 (2006.01)**
- (45) Oversættelsen bekendtgjort den: **2007-05-29**
- (80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse om meddelelse af patentet: **2007-02-14**
- (86) Europæisk ansøgning nr.: **02758554.6**
- (86) Europæisk indleveringsdag: **2002-08-30**
- (87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: **2004-05-26**
- (86) International ansøgning nr.: **GB2002003941**
- (87) Internationalt publikationsnr.: **WO2003020974**
- (30) Prioritet: **2001-08-31 US 944951**
- (84) Designerede stater: **AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR**
- (73) Patenthaver: **The Chinese University of Hong Kong, Room 226, Pi Ch'iu Building, Shatin, New Territories, Hong Kong SAR, Kina**
- (72) Opfinder: **LO, Yuk Ming Dennis, Flat 15C, Arran Court, 2 Shekku Street, Homantin, Kowloon, Hong Kong, Kina POON, Lit Man, Flat 21H BLK 2, Phase 3, Belvedere Garden, Tsuen Wan NT, Hong Kong, Kina**
-
- (74) Fuldmægtig i Danmark: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark**
- (54) Benævnelse: **Fremgangsmåder til detektion af DNA, som stammer fra forskellige individer**
- (56) Fremdragne publikationer:
YAMANE A ET AL: "X chromosome methylation-based chimerism assay for sex-mismatched hematopoietic stem cell transplantation." BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 28, no. 10, 2 November 2001 (2001-11-02), pages 969-973, XP002247508 ISSN: 0268-3369
POON LEO L M ET AL: "Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 35-41, XP002247509 ISSN: 0009-9147
MANGIONI S ET AL: "Long-term persistence of hemopoietic chimerism following sex-mismatched bone marrow transplantation." BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 20, no. 11, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 969-973, XP002247510 ISSN: 0268-3369
LO Y M DENNIS: "Fetal DNA in maternal plasma: Biology and diagnostic applications." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 46, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 1903-1906, XP002247511 ISSN: 0009-9147
SUZUKI HIROMU ET AL: "Quantitative DNA methylation analysis by fluorescent polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism using an automated DNA sequencer." ELECTROPHORESIS, vol. 21, no. 5, March 2000 (2000-03), pages 904-908, XP002247512 ISSN: 0173-0835

HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL
PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS"
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON,
US, vol. 93, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 9821-9826,
XP002910406 ISSN: 0027-8424

Titel: Fremgangsmåder til detektion af DNA, som stammer fra forskellige individer.

Opfindelsens baggrund

5

Tilstedeværelsen af DNA, som stammer fra forskellige individer, i vævsvæsker er et velkendt biologisk fænomen i mange kliniske og biologiske scenarier. F.eks. vil transplantationsmodtagerens hæmopoietiske system efterfølgende knoglemarvstransplantation bestå af forskellige størrelsesandele af donorens og modtagerens celler. Konstateringen af mængden af donor- eller modtager-
10 celler er blevet udført ved detektion af genetiske forskelle mellem donoren og modtageren, herunder køn (Mangioni et al., Bone Marrow Transplant **20**: 969 – 73, 1997), og DNA-polymorfismer (Roux et al., Blood **79**: 2775 – 83, 1992). Konsekvensen af denne fremgangsmåde er, at hvis den analyserede region ikke bærer en genetisk forskel mellem donoren og modtageren, da vil analyse
15 ved hjælp af den for øjeblikket værende fremgangsmåde ikke være mulig.

I et andet eksempel er detektion af føtalt DNA i maternelt plasma og serum under graviditet tidligere blevet vist (Lo et al., Lancet **350** (9076): 485 – 7, 1997).
20 Denne teknologi har vist, at føtalt DNA, som er isoleret fra maternelt plasma og serum, kan anvendes til ikke-invasiv, prænatal diagnose (Lo et al., N. Eng. J. Med. **339** (24): 1734 – 8, 1998; Faas et al., Lancet **352** (9135): 1196, 1998; Amicucci et al., Clin. Chem. **46** (2): 301, 2000; Chen et al., Prenat. Diagn. **20** (4): 355 – 7, 2000; Saito et al., Lancet **356**: 1170, 2000). Den kliniske anvendelse af dette fænomen har været hjulpet af de relativt høje absolutte og relative
25 koncentrationer af sådant cirkulerende føtalt DNA i maternelt plasma og serum (Lo et al., Am. J. Hum. Genet. **62**: 768 – 775, 1998). Ved anvendelse af denne fremgangsmåde er der blevet opnået non-invasiv, prænatal detektion af en række tilstande, herunder føtal rhesus D-status (Lo et al., New Eng. J. Med. **339**: 1734 – 1738, 1998), myotonisk dystrofi (Amicucci et al., Clin. Chem. **46**: 301 – 302, 2000), achondroplasi (Saito et al., Lancet **356**: 1170, 2000) og visse kromosomale translokationer (Chen et al., Prenat. Diagn. **20**: 335 – 357, 2000; Chen et al., Clin. Chem. **47**: 937 – 939, 2001). Ved alle disse for øjeblikket væ-

rende fremgangsmåder har man anvendt detektionen af DNA-sekvenser, der er nedarvet fra faderen, og som er genetisk skelnelige fra dem fra moderen (Bianchi, Am. J. Hum. Genet. **62** (4): 763, 1998). Nærmere betegnet har det været antaget, at detektionen af DNA, som fosteret har nedarvet fra moderen i mater-

5 nelt plasma eller serum, er umuligt. Lignende begrænsninger er også blevet beskrevet for detektion af føtalt, kerneholdige celler, som er isoleret fra den cellulære fraktion af maternelt blod (Lo et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. **731**: 204, 1994).

Andre har detekteret afvigende methyleret DNA fra cancerpatienter. Dette er

10 blevet rapporteret for patienter med en række forskellige cancere, herunder lunge- (Esteller et al., Cancer Res. **59** (1): 67, 1999) og levercancer (Wong et al., Cancer Res. **59** (1): 71, 1999).

For nylig er der blevet fokuseret meget interesse på epigeniske fænomeners bi-

15 ologi, nemlig processer, som forandrer fænotypen, men som ikke er associeret med ændringer i DNA-sekvensen (Wolffe, Science **286**: 481 – 486, 1999). Én af de bedst karakteriserede epigeniske processer er DNA-methylering (Wolffe et al., Curr. Biol. **10**: R463 – R465, 1999). En fremgangsmåde til skelnen af DNA-

20 typer, som stammer fra forskellige individer, i biologiske væsker, hvor der anvendes epigenetiske, snarere end genetiske, forskelle mellem DNA-arterne, ville være af meget høj værdi. F.eks. ville den epigenetiske detektion af føtalt DNA i en maternel prøve tilvejebringe et betydeligt fremskridt ved at muliggøre yderligere screenings- og diagnostiske metoder.

25 Resumé af opfindelsen

I et første aspekt angår den foreliggende opfindelse fremgangsmåder til differentiering af DNA-typer, som stammer fra forskellige individer, i en biologisk prøve. I foretrukne udførelsesformer anvendes fremgangsmåderne ifølge den

30 foreliggende opfindelse til at differentiere eller detektere føtalt DNA i en maternel prøve, eller at differentiere DNA fra en organdonor fra DNA fra en organmodtager.

Fagfolk vil erkende, at den biologiske prøve, som opnås fra et individ, kan tages fra en hvilken som helst væske- eller celleprøve, ved foretrukne udførelsesformer er legemsvæsken dog plasma eller serum. I foretrukne udførelsesformer skelnes DNA-typerne ved at observere epigenetiske forskelle i DNA-typerne, såsom forskelle i DNA-methylering. F.eks. kan den epigenetiske markør i situationer, hvor én DNA-type kommer fra en mand, og én DNA-type kommer fra en kvinde, være det inaktiverede X-kromosom fra kvinden. I sådanne udførelsesformer kan der anvendes methylerede DNA-sekvenser på det inaktiverede X-kromosom til at detektere DNA, som stammer fra kvinden. I visse udførelsesformer kan de epigenetiske forskelle analyseres inden i celler. Derudover kan de epigenetiske forskelle i visse udførelsesformer analyseres ved anvendelse af *in situ*-methylerings-specifik polymerasekædereaktion. Derudover kan de epigenetiske forskelle anvendes til at sortere eller isolere celler fra de respektive individer eller til at oprense DNA fra de respektive individer. Fremgangsmåderne ifølge den foreliggende opfindelse kan udføres med eller uden måling af koncentrationerne af DNA-typer; i foretrukne udførelsesformer måles dog koncentrationerne af DNA-typer med de respektive epigenetiske forskelle. Sådanne måling af koncentrationer medfører måling af de respektive DNA-methyleringsforskelle i udførelsesformer, hvor DNA-methyleringsforskelle er den epigenetiske markør. I særligt foretrukne udførelsesformer sættes der natriumbisulfit til den biologiske prøve eller til DNA-typer direkte for at detektere DNA-methyleringsforskellene. I andre udførelsesformer kan en methylerings-specifik polymerasekædereaktion, som er velkendt af fagfolk, dog anvendes til at detektere DNA-methyleringsforskellene. I endnu andre udførelsesformer kan der anvendes DNA-sekventering eller primerforlængelse til at detektere methyleringsforskellene.

I et andet aspekt angår opfindelsen fremgangsmåder til detektion af anormaliteter i et foster ved at detektere føtalt DNA i en biologisk prøve, som er opnået fra en moder. Fremgangsmåderne ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringer detektion af føtalt DNA i en maternel prøve ved at skelne det føtale DNA fra det maternelle DNA på basis af epigenetiske markører, såsom forskelle i DNA-methylering. Ved at anvende sådanne fremgangsmåder kan føtalt DNA, som er

prædiktivt for genetisk unormale eller genetisk baserede sygdomme, identificeres, for derved at tilvejebringe fremgangsmåder til prænatal diagnose. Disse fremgangsmåder er anvendelige ved en hvilken som helst og alle graviditets-associerede tilstande, for hvilken methyleringsændringer, som er associeret med en sygdomstilstand, identificeres. Eksempler på sygdomme, som kan diagnosticeres, omfatter f.eks. præeklampsi, en kromosomal aneuploidisering, herunder, men ikke begrænset til, trisomi 21, Prader-Willi's syndrom og Angelman's syndrom.

10 Som ved de bredere differentieringsfremgangsmåder ifølge det første aspekt af opfindelsen er den biologiske prøve, som er opnået fra moderen, fortrinsvist plasma eller serum. Differentieringen mellem maternelt og føtalt DNA kan udføres med eller uden kvantificering af koncentrationen af føtalt DNA i materielt plasma eller serum. I udførelsesformer, hvor det føtale DNA kvantificeres, kan den målte koncentration anvendes til at forudsige, overvåge eller diagnosticere eller prognosticere en graviditets-associeret lidelse. I foretrukne udførelsesformer er den givne foster-afledte, epigenetiske markør associeret med en føtal lidelse, og i nogle udførelsesformer anvendes der et epigenetisk kendetegn i føtale celler i placenta som en foster-specifik markør i maternelt plasma eller serum.

I et tredje aspekt angår den foreliggende opfindelse fremgangsmåder til at skelne DNA-typer, som stammer fra en organdonor, fra dem fra en organmodtager. Som ved de bredere differentieringsfremgangsmåder ifølge det første aspekt af opfindelsen er den opnåede, biologiske prøve fortrinsvist plasma eller serum. Differentieringen mellem DNA fra organdonoren og organmodtageren eller en mulig organdonor og mulig organmodtager kan udføres med eller uden kvantificering af DNA-koncentrationen i den biologiske prøve. Denne udførelsesform er særlig nyttig i tilfælde, hvor transplantationen er en knoglemarvstransplantation.

30 Sådanne målinger kan anvendes til at forudsige den kliniske progression af transplantationsmodtageren, især hvad angår organafstødning.

I et fjerde aspekt angår den foreliggende opfindelse kits til differentiering af DNA-typer, som stammer fra forskellige individer, i en biologisk prøve. Sådanne kits er nyttige, f.eks. til differentiering eller detektion af tilstedeværelsen af føtal DNA i en maternel, biologisk prøve eller til differentiering af DNA fra en organ-
5 donor eller potentiel organ donor fra det fra en organmodtager eller potentiel organmodtager. Kit'ene ifølge den foreliggende opfindelse omfatter ét eller flere reagenser til bestemmelse af det materielle DNA's metyleringsstatus, såsom natriumbisulfit, samt ét eller flere reagenser til detektion af tilstedeværelsen af DNA, såsom en gel. Derudover kan sådanne kits omfatte ét eller flere reagen-
10 ser til amplificering af mængden af DNA, som er til stede i prøven, såsom ét eller flere reagenser til udførelse af polymerasekædereaktionsamplificering. Sådanne reagenser er velkendte af fagfolk. Derudover kan sådanne kits omfatte ét eller flere apparater til opnåelse af en maternel DNA-prøve. Sådanne apparater er velkendte af fagfolk. Især kan kit'ene ifølge den foreliggende opfindelse an-
15 vendes til diagnosticering af en sygdom, som kun eller delvist skyldes en genetisk anomali, såsom en mutation, substitution eller deletion i hele eller en del af en DNA-sekvens, som er til stede i et foster. Eksempler på sygdomme, som kan diagnosticeres, omfatter f.eks. præeklampsi, en kromosomal aneuploidisering, herunder, men ikke begrænset til, trisomi 21, Prader-Willi's syndrom og Angel-
20 man's syndrom.

Kort beskrivelse af tegningerne

Figur 1 viser resultaterne af et assay til detektion af methylerede og umethyle-
25 rede DNA-sekvenser fra det androgene receptorgen. I alt blev der rekrutteret 6 mandlige og 11 raske kvindelige individer. Af alle de mandlige kontrolindivider blev der kun detekteret det umethylerede androgenreceptorgen i disse prøver, som det var forventet (fig. 1A). I modsætning hertil blev der observeret både umethylerede og methylerede androgenreceptorgen DNA-sekvenser i de kvin-
30 delige kontrolindivider (fig. 1A). Detektionsraterne af methylerede og umethylerede androgenreceptorgener i disse kvindelige individer var henholdsvis 100 % og 82 %. Når DNA-prøverne ikke blev analyseret i assayet, blev der ikke detekteret noget positivt signal (fig. 1A). Interessant nok blev der observeret positive

signaler for både methylerede og umethylerede DNA-sekvenser i alle knoglemarvstransplantationsmodtagere med kvindelige donorer, hvilket indikerer, at celler fra kvindelige donorer forefindes i mandlige modtageres blodkredsløb.

- 5 Figur 2 tilvejebringer en skematisk afbildning af den differentielt methylerede region (DMR) i den humane IGF2-H19-region. De to gentagelser på 450 bp (A1 og A2) og syv gentagelsesenheder (B1 – B7) på 400 bp er vist. De mulige methyleringssteder på den øverste DNA-streng af den undersøgte region er repræsenteret af åbne cirkler. Det undersøgte enkeltnucleotidpolymorfisme-
 10 (SNP) –sted (A/G) er angivet med et åbent kvadrat. Åbne pile repræsenterer lokaliseringen af de fremadrettede (for) og reverse (rev) primere i PCR-reaktioner, som er specifikke for henholdsvis de methylerede (M) og umethylerede (U) alleler. Sekvenserne af disse MSP-primere er vist. Sekvensforskellene mellem bisulfit-behandlet DNA og ubehandlet DNA er fremhævet med fede typer i kursiv, og sekvensforskelle mellem methyleret (paternelt-nedarvet) og umethyleret
 15 (maternelt-nedarvet) DNA er angivet i fede typer med understregning.

Figur 3 viser detektion af methyleret (paternelt-nedarvet) DNA i 3. trimester (a) og 2. trimester (b) maternelt plasma. DNA-sekvenser af methylerede alleler i
 20 maternelle fibrinlags- (felt 1), føtale fibrinlags- eller fostervands- (felt 2), prænatale, maternelle plasma- (felt 3) og postnatale, maternelle plasma- (felt 4) -prøver er vist. Tilstedeværelsen af methyleret, føtalt DNA i den prænatale, maternelle plasmaprøve er angivet med *. Polymorfisme- (SNP) –stedet er vist med røde bogstaver.

25

Figur 4 viser detektion af umethyleret (maternelt-nedarvet), føtalt DNA i maternelt plasma. (a) Umethylerede DNA-sekvenser blev detekteret i maternelt fibrinlag (felt 1) og i en maternel prøve fra tredje trimester (felt 2) ved anvendelse af direkte sekventering. Tilstedeværelsen af umethyleret, føtalt DNA i maternelt
 30 plasma er angivet med *. (b) Umethyleret, føtalt DNA (pil) blev detekteret i to maternelle plasmaprøver fra tredje trimester ved anvendelse af primerforlængelsesassayet. (c) Umethyleret, føtalt DNA (pil) blev detekteret i en maternel plasmaprøve fra andet trimester ved anvendelse af primerforlængelsesassayet.

Produkter fra kontrolreaktionerne, som kun viser primer, umethyleret G-allel eller umethyleret A-allel er vist. Reaktionsprodukternes størrelse (nt) er vist i bunden ●, ubenyttet primer; □, detekteret allel.

5 Beskrivelse af de specifikke udførelsesformer

I et første aspekt angår den foreliggende opfindelse fremgangsmåder til differentiering af DNA-typer, som stammer fra forskellige individer, i en biologisk prøve. I foretrukne udførelsesformer anvendes fremgangsmåderne ifølge den foreliggende opfindelse til at differentiere eller detektere føtalt DNA i en maternal prøve, eller at differentiere DNA fra en organdonor fra DNA fra en organmodtager.

Fagfolk vil erkende, at den biologiske prøve, som opnås fra et individ, kan tages fra en hvilken som helst væske- eller celleprøve, ved foretrukne udførelsesformer er legemsvæsken dog plasma eller serum. I foretrukne udførelsesformer skelnes DNA-typerne ved at observere epigenetiske forskelle i DNA-typerne, såsom forskelle i DNA-methylering. F.eks. kan den epigenetiske markør i situationer, hvor én DNA-type kommer fra en mand, og én DNA-type kommer fra en kvinde, være det inaktiverede X-kromosom fra kvinden. I sådanne udførelsesformer kan der anvendes methylerede DNA-sekvenser på det inaktiverede X-kromosom til at detektere DNA, som stammer fra kvinden. I visse udførelsesformer kan de epigenetiske forskelle analyseres inden i celler. Derudover kan de epigenetiske forskelle i visse udførelsesformer analyseres ved anvendelse af *in situ*-methylerings-specifik polymerasekædereaktion. Derudover kan de epigenetiske forskelle anvendes til at sortere eller isolere celler fra de respektive individer eller til at oprense DNA fra de respektive individer. Fremgangsmåderne ifølge den foreliggende opfindelse kan udføres med eller uden måling af koncentrationerne af DNA-typer; i foretrukne udførelsesformer måles dog koncentrationerne af DNA-typer med de respektive epigenetiske forskelle. Sådanne måling af koncentrationer medfører måling af de respektive DNA-methyleringsforskelle i udførelsesformer, hvor DNA-methyleringsforskelle er den epigenetiske markør. I særligt foretrukne udførelsesformer sættes der na-

triumbisulfit til den biologiske prøve eller til DNA-typer direkte for at detektere DNA-metyleringsforskellene. I andre udførelsesformer kan en metylerings-specifik polymerasekædereaktion, som er velkendt af fagfolk, dog anvendes til at detektere DNA-metyleringsforskellene. I endnu andre udførelsesformer kan
5 der anvendes DNA-sekventering eller primerforlængelse til at detektere metyleringsforskellene.

Som anvendt heri har betegnelsen "biologisk prøve" til hensigt at omfatte en hvilken som helst væskeformig eller cellulær prøve eller blanding deraf, som er
10 opnået fra en levende organisme. Nærmere betegnet omfatter betegnelsen vævsbiopsi-, serum-, plasma- eller fostervandsprøver.

Som anvendt heri har betegnelsen "epigenetisk forskel" til hensigt at omfatte en hvilken som helst anden molekylær eller strukturel forskel end den primære
15 nucleotidsekvens. F.eks. kan dette omfatte forskelle i metylering.

Som anvendt heri har betegnelsen "DNA" til hensigt at omfatte en hvilken som helst sekvens på mere end ét nucleotid, såsom polynucleotider, genfragmenter og komplette gensekvenser.
20

Som anvendt heri anvendes betegnelsen "metyleringsspecifik PCR" til at beskrive en fremgangsmåde, hvorved DNA behandles med natriumbisulfit og derefter gøres til genstand for PCR-amplificering. Denne teknik er baseret på det princip, at behandling af DNA med bisulfit resulterer i omdannelse af umethyle-
25 rede cytosin-rester til uracil. På den anden side forbliver methylerede cytosin-rester uændrede. DNA-sekvenserne i methylerede og umethylerede genomregioner er således efterfølgende bisulfitomdannelse forskellige og skelnelige ved hjælp af sekvensspecifikke PCR-primere.

30 Ifølge den foreliggende opfindelse anvendes fænomenet genomaftryk til at overvinde begrænsningerne fra den kendte teknik. Ved genomt aftryk modificeres DNA-sekvenser biokemisk uden at forandres i DNA-sekvens. Hvis denne proces resulterer i differentiell modifikation af det føtale og det maternelle DNA,

da kan denne forskel udnyttes til at skelne føtalt fra maternelt DNA i maternelt plasma og serum. Dette fænomen kan også anvendes til skelnen af føtale celler fra maternelle celler i den cellulære fraktion fra maternelt blod. Derudover kan princippet også anvendes til at detektere maternelle celler eller DNA, som er gået ind i fosteret/babyens legeme (Lo et al., *Blood* **88** (11): 4390 – 5, 1996; Lo et al., *Clin. Chem.* **46** (9): 1301 – 9, 2000; Maloney et al., *J. Clin. Invest.* **104** (1): 41 – 7, 1999. Dette fænomen kan også anvendes i mange andre kliniske scenarier, hvor celler eller DNA-sekvenser viser sig at være til stede inden i et individs legeme, såsom efterfølgende knoglemarvstransplantation (Lo et al., *Br. J. Haematol.* **89** (3): 945 – 9, 1995) eller transplantation af solide organer (Starzl et al., *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **6** (3): 292 – 8, 1997; Lo et al., *Lancet* **351** (9112): 1329 – 30, 1998; Zhang, *Clin. Chem.* **45** (10): 1741 – 6, 1999).

Den foreliggende opfindelse muliggør udvikling af en køns-uafhængig og polymorfisme-uafhængig markør for føtalt DNA i maternelt plasma/serum. Til udvikling af en køns-uafhængig og polymorfisme-uafhængig, føtal markør kan man anvende DNA-sekvenser, som fortrinsvist og specifikt methyleres i trofoblaster (Ohgane et al., *Dev. Genet.* **22** (2): 132 – 40, 1998). Dette overvinder de for øjeblikket værende begrænsninger, som kun let kan detektere tilstedeværelsen af DNA fra en mandligt foster i moderens plasma/serum (ved anvendelse af Y-kromosomet som mål) (Lo et al., *Am. J. Hum. Genet.* **62** (4): 768, 1998). Den tilvejebringer detektionsmetoder, som er forskellige fra at være afhængig af sekvens-forskelle i føtalt og maternelt DNA til udførelse af en sådan skelnen (Tang et al., *Clin. Chem.* **45** (11): 2033 – 5, 1999; Pertl et al., *Hum. Genet.* **106**: 45 – 49, 2000).

Udviklingen af molekylære detektionsmetoder, såsom PCR, har tilvejebragt mange kraftfulde værktøjer til overvågningen af kimærisme efterfølgende knoglemarvstransplantation (BMT). Én af de mest bredt anvendte PCR-baserede tests til detektion af post-BMT-kimærismer i køns-fejlparringstilfælde er PCR for sekvenser på Y-kromosomet (Lo et al., *Br. J. Haematol.* **89**: 645 – 9, 1995). Denne strategis begrænsning er, at den kun kan anvendes i tilfælde, hvor donoren er mandlig, og modtageren er kvindelig. Ifølge den foreliggende opfindelse

- tilvejebringes der et system, som kan anvendes i situationer, hvor donoren er kvindelig, og modtageren er mandlig. Det faktum, at fænomenet Lyonisering kun forefindes i individer af hunkøn, kan udnyttes til at udvikle en hunkønsspecifik markør. Ved dette fænomen deaktiveres det ene af de to X-kromosomer i et individ af hunkøn tilfældigt med forekomst af ved methylering inaktiverede gener. Dette muliggør et assay til detektion af hunkøns-DNA ved et overskud af hankøns-DNA, hvilket kan anvendes til BMT med hunkønsdonorer og hankønsmodtagere.
- 10 I et andet aspekt angår opfindelsen fremgangsmåder til detektion af anormaliteter i et foster ved at detektere føtalt DNA i en biologisk prøve, som er opnået fra en moder. Fremgangsmåderne ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringer detektion af føtalt DNA i en maternel prøve ved at skelne det føtale DNA fra det maternelle DNA på basis af epigenetiske markører, såsom forskelle i DNA-methylering. Ved at anvende sådanne fremgangsmåder kan føtalt DNA, som er prædiktivt for genetisk unormale eller genetisk baserede sygdomme, identificeres, for derved at tilvejebringe fremgangsmåder til prænatal diagnose. Disse fremgangsmåder er anvendelige ved en hvilken som helst og alle graviditetsassocierede tilstande, for hvilken der identificeres methyleringsændringer, som er associeret med en sygdomstilstand. Eksempler på sygdomme, som kan diagnosticeres, omfatter f.eks. præeklampsi, en kromosomal aneuploidisering, herunder, men ikke begrænset til, trisomi 21, Prader-Willi's syndrom og Angelman's syndrom.
- 25 Som ved de bredere differentieringsfremgangsmåder ifølge det første aspekt af opfindelsen er den biologiske prøve, som er opnået fra moderen, fortrinsvist plasma eller serum. Differentieringen mellem maternelt og føtalt DNA kan udføres med eller uden kvantificering af koncentrationen af føtalt DNA i materielt plasma eller serum. I udførelsesformer, hvor det føtale DNA kvantificeres, kan den målte koncentration anvendes til at forudsige, overvåge eller diagnosticere eller prognosticere en graviditets-associeret lidelse. I foretrukne udførelsesformer er den givne foster-afledte, epigenetiske markør associeret med en føtal lidelse, og i nogle udførelsesformer anvendes der et epigenetisk kendetegn i fø-
- 30

tale celler i placenta som en foster-specifik markør i maternelt plasma eller serum.

Ifølge den foreliggende opfindelse anvendes der differentielt methylerede, føtale DNA-sekvenser, som ikke behøver at være skelnelige, hvad angår DNA-sekvens fra maternelt DNA, som markører for noninvasiv, prænatal diagnose. Denne hidtil ukendte fremgangsmåde kan omdanne foster-moder-par, som ikke er informative ved den traditionelle fremgangsmåde, til at være informative for prænatal diagnose. Den foreliggende opfindelse tilvejebringer således en platform, på hvilken en ny generation af noninvasive, prænatale tests kan bygges.

Fremgangsmåderne ifølge den foreliggende opfindelse er baseret på detektionen af differentielt methyleret DNA af føtal oprindelse i gravide kvinders plasma eller serum. Differentielt methylerede DNA-sekvenser, som kan indeholde enkeltnucleotid-polymorfisme, detekteres fortrinsvist ved methylerings-specifik polymerasekædereaktion (PCR); men i princippet kan en hvilken som helst detektionsmetode til differentielt methyleret DNA anvendes. Denne fremgangsmåde muliggør anvendelsen af traditionelle, uinformative, føtale DNA-markører til prænatal diagnose.

20

Ifølge den foreliggende opfindelse muliggøres detektion eller forudsigelse af tilstedeværelsen af en hvilken som helst lidelse i fosteret eller moderen, som er associeret med en ændring i en DNA-sekvens' methyleringsstatus. Eksempler omfatter imprintingslidelser, såsom Prader-Willi's syndrom (Kubota et al., Nat. Genet. **16** (1): 16 – 7, 1997). Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en ny type test til præeklampsi, som har været foreslået at være en imprintingslidelse (Graves, Reprod. Fert. Dev. **10** (1): 23 – 9, 1998). Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes der yderligere en ny type test til kromosomal aneuploidisering, herunder Down's syndrom (trisomi 21), som kan være associeret med methyleringsændringer (Yu et al., PNAS USA **94** (13): 6862 – 7, 1997).

30

Den foreliggende opfindelse angår anvendelse af DNA-methyleringsforskelle mellem moderen og fosteret, for derved at overvinde begrænsningerne fra den kendte teknik i detektion af føtalt DNA i maternelt plasma.

5 I et tredje aspekt angår den foreliggende opfindelse fremgangsmåder til at skelne DNA-typer, som stammer fra en organdonor, fra dem fra en organmodtager. Som ved de bredere differentieringsfremgangsmåder ifølge det første aspekt af opfindelsen er den opnåede, biologiske prøve fortrinsvist plasma eller serum. Differentieringen mellem DNA fra organdonoren og organmodtageren eller en
10 mulig organdonor og mulig organmodtager kan udføres med eller uden kvantificering af DNA-koncentrationen i den biologiske prøve. Denne udførelsesform er særlig nyttig i tilfælde, hvor transplantationen er en knoglemarvstransplantation. Sådanne målinger kan anvendes til at forudsige den kliniske progression af transplantationsmodtageren, især hvad angår organafstødning.

15

I et fjerde aspekt angår den foreliggende opfindelse kits til differentiering af DNA-typer, som stammer fra forskellige individer, i en biologisk prøve. Sådanne kits er nyttige, f.eks. til differentiering eller detektion af tilstedeværelsen af føtalt DNA i en maternel, biologisk prøve eller til differentiering af DNA fra en organ-
20 donor eller potentiel organdonor fra det fra en organmodtager eller potentiel organmodtager. Kit'ene ifølge den foreliggende opfindelse omfatter ét eller flere reagenser til bestemmelse af det materielle DNA's methyleringsstatus, såsom natriumbisulfid, samt ét eller flere reagenser til detektion af tilstedeværelsen af DNA, såsom en gel. Derudover kan sådanne kits omfatte ét eller flere reagen-
25 ser til amplificering af mængden af DNA, som er til stede i prøven, såsom ét eller flere reagenser til udførelse af polymerasekædereaktionsamplificering. Sådanne reagenser er velkendte af fagfolk. Derudover kan sådanne kits omfatte ét eller flere apparater til opnåelse af en maternel DNA-prøve. Sådanne apparater er velkendte af fagfolk. Især kan kit'ene ifølge den foreliggende opfindelse an-
30 vendes til diagnosticering af en sygdom, som kun eller delvist skyldes en genetisk anomali, såsom en mutation, substitution eller deletion i hele eller en del af en DNA-sekvens, som er til stede i et foster. Eksempler på sygdomme, som kan diagnosticeres, omfatter f.eks. præeklampsi, en kromosomal aneuploidisering,

herunder, men ikke begrænset til, trisomi 21, Prader-Willi's syndrom og Angelman's syndrom.

Eksempel 1

5

Detektion af post-knoglemarvstransplantationskimærisme

Epigenetisk fremgangsmåde

10 Materialer og metoder

Individer og prøver

Fire mandlige marvtransplantationsmodtagere, som modtog knoglemarv fra kvindelige donorer, og 17 normale, raske individer blev rekrutteret ved denne undersøgelse. Fibrinlag (BC) fra alle de rekrutteredes EDTA-blodprøver blev høstet og opbevaret ved -20 °C som beskrevet (Lo et al., Am. J. Hum. Genet. **62**: 768 – 75, 1998).

20 DNA-isolering

Der blev ekstraheret DNA fra BC'et ved anvendelse af et Nucleon DNA Extraction Kit (Scotlabs) ifølge producentens anbefalinger.

25 Bisulfit-omdannelse

Der blev udført bisulfit-modifikation af DNA-prøver ved anvendelse af CpGenome DNA Modification Kit (Intergen) som instrueret af producenten. Ved bisulfitomdannelse omdannes umethylerede cytosinrester til uracil, mens methylerede cytosinrester forbliver uændrede (Herman et al., PNAS USA **93**: 9821 – 6, 1996). Sekvensforskellen mellem methyleret og umethyleret DNA efterfølgende bisulfitomdannelse skelnes derefter ved anvendelse af forskellige PCR-primere. Der blev anvendt 1 µg BC-DNA i bisulfit-omdannelses-reaktionen.

Methyleringsspecifik PCR (MSP)

MSP-assays blev modificeret fra protokollen som beskrevet af Herman et al., ovenfor. Primerne M-for (5'-GCGAGCGTAGTATTTTTTCGGC-3') og M-rev (5'-AACCAAATAACCTATAAAACCTCTACG-3') blev designet til den methylerede sekvens, mens primerne U-for (5'-GTTGTGAGTGTAGTATTTTTTGGT-3') og U-rev (5'-CAAATAACCTATAAAACCTCTACA-3') blev designet til den umethylerede sekvens. Fem µl bisulfit-behandlet DNA blev sat til en PCR-reaktionsblanding på 50 µl, der indeholdt 5 µl 10 x TaqMan-buffer A (PE Applied Biosystems), 2 mM MgCl₂, 10 pmol dNTP'er, 20 pmol af hver af de tilsvarende MSP-primere og 1,25 U AmpliTaq Gold DNA-polymerase (PE Applied Biosystems). Reaktionsblandingerne blev kørt gennem en termisk cyklus (methyleret allel: 95 °C i 45 s, 58 °C i 30 s, 72 °C i 20 s; umethyleret allel: 95 °C i 45 s, 50 °C i 30 s, 72 °C i 20 s) i 45 cykler, med et initialt denatureringstrin på 8 min ved 95 °C. PCR-produkterne blev derefter analyseret ved agarosegelelektroforese.

Resultater

Dette forsøg tilvejebringer et MSP-assay til detektion af methylerede og umethylerede DNA-sekvenser fra det androgene receptorgen. I alt blev der rekrutteret 6 raske mænd og 11 raske kvinder. Af alle de mandlige kontrolindivider blev der kun detekteret det umethylerede androgenreceptorgen i disse prøver, som det var forventet (fig. 1A). I modsætning hertil blev der observeret både umethylerede og methylerede androgenreceptorgen DNA-sekvenser i de kvindelige kontrolindivider (fig. 1A). Detektionsraterne af methylerede og umethylerede androgenreceptorgener i disse kvindelige individer var henholdsvis 100 % og 82 %. Når DNA-prøverne ikke blev analyseret i assayet, blev der ikke detekteret noget positivt signal (fig. 1A). Interessant nok blev der observeret positive signaler for både methylerede og umethylerede DNA-sekvenser i alle knoglemarvstransplantationsmodtagere med kvindelige donorer, hvilket indikerer, at celler fra kvindelige donorer forefindes i mandlige modtageres blodkredsløb.

Disse resultater viser for første gang, at methylerede gener på det inaktiverede X-kromosom fra hunkønsindivider kan anvendes som en hunkøns-specifik markør ved forskning i kimærisme. Dette assay er også anvendeligt til undersøgelse af andre typer post-transplantationskimærisme, der medfører blanding af hankøns- og hunkønsceller eller –DNA. Eksempler omfatter cellulær kimærisme efterfølgende transplantation af solide organer (Starzl et al., Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. **6**: 292 – 8, 1997), post-transplantationsplasma-DNA-kimærisme (Lo et al., Lancet **351**: 1329 – 30, 1998) og urinær DNA-kimærisme (Zhang et al., Clin. Chem. **45**: 1741 – 6, 1995). Derudover er der også meget interesse for øjeblikket i passagen af celler og DNA fra moderen ind i fosteret under graviditet (Lo et al., Blood **88**: 4390 – 5, 1996; Maloney et al., J. Clin. Invest. **104**: 41 – 7, 1999; Lo et al., Clin. Chem. **46**: 1301 – 9, 2000). De udviklede, epigeniske markører skulle også anvendes ved kimærisme af maternal oprindelse i afkom af hankøn.

15

Det for øjeblikket værende assay kan udvikles til et kvantitativt format ved anvendelse af f.eks. realtids PCR-teknologi (Lo et al., Cancer Res. **59**: 3899 – 903, 1999). En sådan udvikling ville muliggøre, at vi kunne overvåge niveauerne af kimærisme i en given person. Klinisk kunne et sådant assay have en rolle ved overvågning af transplantat-acceptans ved BMT. I tilfælde af urinær eller plasma-DNA-kimærisme kunne sådant assay også anvendes til overvågning af transplantatafstødning.

25

Eksempel 2

Differentiel DNA-methylering mellem foster og moder som en strategi til detektion af føtalt DNA i maternelt plasma

Nærværende forsøg viser, at ved at anvende en differentielt methyleret region i det humane IGF2-H19-locus som en epigenetisk markør i maternelt plasma, er detektion af en allel, som fosteret har nedarvet fra moderen, mulig. Disse resultater udvider de prænatale, diagnostiske muligheder for føtalt DNA i maternelt plasma betragteligt, og tillader udviklingen af en køns- og polymorfisme-

uafhængig, foster-specifik markør i maternelt plasma samt nye strategier til den prænatale diagnose af imprintingslidelser og visse kromosomale aneuploidiseringer.

5 Materialer og metoder

Individer og prøver

Der blev taget prøver fra gravide kvinder under informeret samtykke. I alt blev der til denne undersøgelse rekrutteret 21 og 18 kvinder i henholdsvis andet trimester (17. – 21. uge) og tredje trimester (37. – 42. uge) af graviditeten. Ingen af de rekrutterede individer havde præeklampsi eller fødsel før terminen, hvad angår deres nuværende graviditet. Der blev udtaget EDTA-maternelt blod og fostervandsprøver fra tilfældene fra andet trimester, som det er beskrevet tidligere (Lo et al., Am. J. Hum. Genet. **62**: 768 – 775, 1998). For tredje trimesters tilfældene udtog vi EDTA-behandlede, maternelle blodprøver ved 2 til 3 h, før end normal vaginal fødsel. EDTA-behandlet fosterblod fra navlestrengen blev også udtaget umiddelbart efter fødslen, som det er beskrevet (Lo et al., Clin. Chem. **46**: 1903 – 1906, 2000). Plasma og fibrinlag fra alle de rekrutterede blodprøver blev høstet og opbevaret ved -20 °C, som beskrevet (Lo et al., Am. J. Hum. Genet. **62**: 768 – 775, 1998), med undtagelse af, at plasmaprøver blev recentrifugeret 16.000 x g. Fostervandsprøver blev opbevaret ved 4 °C.

DNA-isolering

25

Der blev ekstraheret DNA fra plasma- og fostervandsprøver ved anvendelse af et QIAamp Blood Kit (Qiagen). Typisk blev der anvendt 800 µl plasma eller fostervand til DNA-ekstraktion pr. kolonne. Der blev anvendt et elueringsvolumen på 50 – 110 µl. Der blev ekstraheret DNA fra fibrinlaget ved anvendelse af et Nucleon DNA Extraction Kit (Scotlabs) ifølge producentens anbefalinger.

30

Genotypebestemmelse af den DMR-polymorfe region

DMR i det humane IGF2-H19-locus indeholder to gentagelsesenheder på 450 bp og syv gentagelsesenheder på 400 bp (Nakagawa et al., PNAS USA **98**: 591 – 596, 2001) (fig. 2). En A/G-SNP inden i DMR'en Nakagawa et al., ovenfor) blev udvalgt som en markør i vores undersøgelse (fig. 2). Der blev anvendt polymerasekædereaktion (PCR) til at amplificere SNP'en i både maternelle og føtale DNA-prøver. Der blev designet primere ved anvendelse af sekvensen af Homo sapiens-H19-genet (Genbank accessionsnummer AF125183). Typisk blev 2 til 5 µl elueret DNA, der var oprenset fra maternelt fibrinlag, navlestrengs-fibrinlag eller fostervand sat til 25 µl PCR-reaktionsblanding, der indeholdt 2,5 µl 10 x TaqMan-buffer A (PE Applied Biosystems), 3 mM MgCl₂, 6,26 pmol dNTP'er, 5 pmol primere (fremadrettet: 5'-ggACGGAATTGGTTGTAGTT-3'; revers: 5'-AGGCAATTGTTCAGTTCAGTAA-3') og 0,625 U AmpliTaq Gold DNA-polymerase (PE Applied Biosystems) (95 °C i 8 min efterfulgt af 35 cykler af 95 °C i 1 min, 56 °C i 20 s, 72 °C i 20 s). For den fremadrettede primer svarede nucleotiderne i det førstnævnte tilfælde til positionerne 7927 til 7944 af H19-sekvensen (Genbank accessionsnummer AF125183). For den reverse primer var nucleotiderne komplementære med positionerne 8309 til 8329 af H19-sekvensen. PCR-produkterne blev derefter analyseret ved agarosegelelektroforese og DNA-sekventering.

Bisulfit-omdannelse

Bisulfit-modifikation af DNA-prøverne blev udført ved anvendelse af et CpGenome DNA Modification Kit (Intergen) ifølge producentens instruktioner. Ved bisulfit-omdannelse ville umethylerede cytosinrester blive omdannet til uracil; mens methylerede cytosinrester ville forblive uændrede (Herman et al., PNAS USA **93**: 9821 – 9826, 1996). Sekvensforskellen mellem methyleret og umethyleret DNA efterfølgende bisulfit-omdannelse kunne derefter skelnes ved anvendelse af forskellige PCR-primere. I almindelighed blev der anvendt 1 µg fibrinlags-DNA fra maternelt eller navlestrengsblod, eller 93 µl elueret DNA, som var oprenset fra maternelt plasma eller fostervand, i en bisulfit-omdannelses-

reaktion. Bisulfit-behandlet DNA blev derefter elueret i 25 – 50 µl 1 µ Tris-EDTA.

Metylerings-specifik PCR (MSP)

5

MSP-assays blev modificeret fra protokollen som beskrevet (Herman et al., 1996). Fem µl bisulfit-behandlet DNA blev sat til en PCR-reaktionsblanding på 50 µl, som indeholdt 5 µl 10X TaqMan-buffer A (PE Applied Biosystems), 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol dNTP'er, 20 pmol af hver af de tilsvarende MSP-primere (fig. 2) og 1,25 U AmpliTaq Gold DNA-polymerase (PE Applied Biosystems). Primerne M-for og M-rev (fig. 2) blev designet til den methylerede sekvens, mens primerne U-for og U-rev (fig. 2) blev designet til den umethylerede sekvens. Reaktionsblandingerne blev udsat for en termisk cyklus (methyleret allel: 95 °C i 45 s, 55 °C i 20 s, 72 °C i 20 s; umethyleret allel: 95 °C i 45 s, 49 °C i 20 s, 72 °C i 20 s) i 50 (fibrinlags- og fostervands-DNA) eller 56 (plasma-DNA) cykler, med et initialt denatureringstrin på 8 min ved 95 °C. PCR-produkterne blev derefter analyseret ved agarosegelelektroforese. Reaktionsprodukterne blev oprenset ved anvendelse af Microspin S-300 HR-kolonner (Amersham Pharmacia) med henblik på DNA-sekventering eller primerforlængelsesassayet.

20

DNA-sekventering

De oprensede PCR-produkter blev sekventeret ved anvendelse af et ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) samt de tilsvarende, fremadrettede primere fra PCR-produkterne. Sekventeringsprodukterne blev analyseret ved anvendelse af en ABI Prism 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems).

Primerforlængelsesassay

30

To µl af det oprensede MSP-produkt blev sat til 25 µl reaktionsblanding, der indeholdt 50 µM ddATP (2',3'-dideoxyadenintriphosphat), 50 µM dGTP, 50 µM dTTP, 0,2 pmol Cys-5-mærket primer (5'-GGGTTATTTGGGAATAGGATATTT-

A-3'), 4 U Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia) og 1,43 µl koncentreret buffer. Reaktionsblandingerne blev udsat for termisk cykling i 40 cykler (90 °C i 30 s, 51 °C i 20 s, 72 °C i 20 s). Den Cys-5-mærkede primer havde en længde på 25 nucleotider (nt), og det polymorfe sted var 2 nt væk fra primerens 3'-ende. For A-allelen ville inkorporering af ddATP'et på dette polymorfe sted frembringe kædeterminering, hvilket således resulterer i et ekstensionsprodukt på 27 nt (dvs. 25 + 2 nt). For G-allelen ville kædeforlængelse fortsætte, indtil den næste A-rest, som var 5 nt væk fra primerens 3'-ende, hvilket således ville resultere i et ekstensionsprodukt på 30 nt (dvs. 25 + 5 nt). Reaktionsprodukterne blev udsat for elektroforese ved anvendelse af en denatureringspolyacrylamidgel på 14 % og analyseret ved anvendelse af en ALF Express Sequencer (Amersham Pharmacia). Data blev analyseret ved hjælp af AlleleLinks-programmet (Amersham Pharmacia).

15 Resultater

Genotypebestemmelse af DMR

Niogtredive gravide kvinder blev rekrutteret til denne undersøgelse. Der blev bestemt maternel genotype ved SNP inden for DMR'en (fig. 2) ved direkte sekventering af PCR-produkterne fra fibrinlags-DNA. Antallet af gravide kvinder med hver af de mulige genotyper var 17 (GG, 43,6 %), 16 (AG, 41,0 %) og 6 (AA, 15,4 %).

25 Detektion af føtalt DNA i plasma fra kvinder, som var heterozygote for en biallel polymorfisme

De 16 kvinder, som var heterozygote (dvs. AG) for SNP'en, blev udvalgt til yderligere undersøgelse. Da dette er en biallel polymorfisme, ville disse kvinder ikke være at betragte som informative for dette polymorfismelocus for detektion af føtalt DNA i maternelt plasma baseret på tidligere kriterier (Lo et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. **731**: 204 – 213, 1994; Bianchi, Am. J. Hum. Genet. **62**: 763 – 764, 1998). For at vise, at differentiell methylering i denne genomregion ville gøre det

muligt for os at overvinde denne begrænsning, blev maternelt DNA behandlet med bisulfit og amplificeret ved MSP ved anvendelse af de i fig. 2 viste primere. På lignende vis blev føtalt DNA, som var isoleret fra fostervand (prøver fra 2. trimester) eller fibrinlag fra navlestrengsblod (prøver fra 3. trimester) gjort til
5 genstand for PCR og MSP til bestemmelse af fosterallelernes imprintingsstatus.

Blandt de 16 udvalgte tilfælde var de methylerede (dvs. de paternelt-nedarvede) alleler fra de 4 3. trimester- og de syv 2. trimester-føtale prøver forskellige fra de respektive mødres methylerede alleler (fig. 3 a, b; sammenlign felterne 1 og 2).
10 For at teste, om denne differentialmethylering mellem foster og moder ville muliggøre, at den føtale allel kunne detekteres fra maternelt plasma, blev maternelt plasma-DNA fra disse tilfælde gjort til genstand for bisulfit-omdannelse, efterfulgt af MSP. Det var interessant, at den paternelt-nedarvede, methylerede, føtale allel kunne detekteres i to 3. trimester- og fire 2. trimester-maternelle plasmaprøver (fig. 3 a, b; felterne 3). For at udelukke den mulighed, at disse observationer blot skyldtes eksistensen af afvigende methyleret, maternelt DNA i maternelt plasma, indsamlede vi en postnatal, maternel plasmaprøve (~ 3,5 år efter fødslen) fra ét af de positive tilfælde med henblik på yderligere undersøgelse. Vi observerede ikke den yderligere methylerede allel i denne postnatale
15 prøve (fig. 3a, felt 4), hvilket indikerede, at den yderligere methylerede allel i maternelt plasma under graviditet var af føtal oprindelse. Derudover blev der ikke observeret noget positivt signal i plasma fra noninformative tilfælde (n = 4, data ikke vist), hvilket således yderligere viser specificiteten af dette MSP-assay. Samlet set indikerer disse data, at anvendelsen af differentiell methylering mellem moder og foster muliggør detektion af føtalt DNA i maternelt plasma, selv i tilfælde, som ikke er at betragte som informative med eksisterende
20 kriterier.

Detektion af føtalt-afledt maternelt-nedarvet DNA fra maternelt plasma

30

Derefter testede vi, om anvendelsen af differentiell methylering mellem moder og foster kunne gøre det muligt for os at detektere en allel, som fosteret har nedarvet fra moderen. Denne type analyse har tidligere været antaget at være

umulig (Lo et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **731**: 204 – 213, 1994; Bianchi, *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 763 – 764, 1998). Da den maternelt-nedarvede allel var umethyleret, blev primerne U-for og U-rev (fig. 2) anvendt til at amplificere den umethylerede allel efterfølgende bisulfit-omdannelse. Blandt de 16 analyserede tilfælde var tre 3. trimester- og fem 3. trimester, maternelle prøver informative. I disse tilfælde besad fosteret en umethyleret allel, som var forskellig fra moderens umethylerede allel. Disse resultater indebærer, at i disse tilfælde havde moderen sin oprindelige allel fra hendes far, og derefter passerede den videre til fosteret. Af disse 8 informative tilfælde blev der kun observeret et svagt positivt signal i én af 3. trimester-prøverne efter direkte sekventering (fig. 4a, sammenligning af felt 1 og felt 2).

Vi resonerede, at dette svage signal i dette enkle, positive tilfælde og lave detektionsrate af den umethylerede, føtale allel fra maternelt plasma kunne skyldes den direkte sekventeringsmetodes lave følsomhed. For at øge detektionens følsomhed anvendte vi et mere følsomt primerforlængelsesassay til at detektere den umethylerede, føtale allel fra MSP-reaktionsprodukterne. Da SNP'en var en A/G-polymorfisme, blev der anvendt ddATP som reaktionssubstrat i primerforlængelsesassayet. Forlængede reaktionsprodukter fra A- og G-allelerne havde henholdsvis en længde på 27 og 30 nt. Der var ikke noget føtalt-specifikt reaktionsprodukt til stede i tilsvarende, maternelle fibrinlagsprøver (fig. 4b, c; maternelt BC). Det er bemærkelsesværdigt, at der blev observeret fosterspecifikke forlængelsesprodukter i to maternelle 3. trimester- (fig. 4b, pil) og én 2. trimester (fig. 3c, pil) plasmaprøve(r), hvilket indikerer tilstedeværelsen af umethyleret, føtalt DNA i maternelt plasma. Som kontroller var ingen af de testede, noninformative tilfælde positive i dette assay (n = 5, data ikke vist). Disse resultater viste for første gang gennemførligheden ved at anvende epigenetiske markører til detektion af en føtalt-afledt, maternelt-nedarvet DNA-sekvens fra maternelt plasma.

Diskussion

Disse resultater viser, at anvendelsen af epigenetiske markører overvinder de traditionelle begrænsninger ved detektion af føtalt DNA i maternelt plasma. Det er muligt at detektere en paternel-nedarvet, føtal allel, som er genetisk uskelnelig fra en maternel allel, fra moderens plasma ved anvendelse af epigenetiske forskelle mellem moderen og fosteret. På lignende vis er det muligt at detektere en maternelt-nedarvet, føtal allel fra maternelt plasma. Denne hidtil ukendte, epigenetiske fremgangsmåde vil derfor udvide det repertoire af lidelser, hvor der kan anvendes føtalt DNA i maternelt plasma.

Selv ved anvendelse af relativt ufølsomme metoder, såsom direkte sekventering og primerforlængelse, viser de foreliggende resultater, at det er muligt at detektere differentielt methylerede, føtale DNA-sekvenser fra maternelt plasma. Der var en lavere følsomhed ved detektion af umethyleret, føtalt DNA i maternelt plasma (fig. 4) sammenlignet med det analoge assay for den methylerede allel (fig. 3). Ved anvendelse af mere følsomme detektionssystemer, såsom allel-specifik PCR (Newton et al., *Nucleic Acids Res.* **17**: 2503 – 2516, 1989) og realtids, methyleringsspecifik PCR (Lo et al., *Cancer Res.* **59**: 3899 – 3903, 1999; Eads et al., *Nucleic Acids Res.* **28**: E32, 2000), kunne forøge plasma-baseret epigenetisk analyses følsomhed. Udviklingen af methyleringsspecifik, realtids-PCR er af særlig interesse, da det åbner op for muligheden at kvantificere føtal-specifik methylering i maternelt plasma, som allerede er blevet opnået for detektion af tumor-DNA i kredsløbet (Kawakami et al., *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 1805 – 1811, 2000).

Den mulige indførsel af føtalt DNA i maternelt plasma som et prænatale, rutinediagnostisk værktøj har rejst spørgsmål i relation til behovet for en genetisk markør for cirkulerende, føtalt DNA (Lo et al., *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 768 – 775, 1998; Avent et al., *Vox Sang* **78**: 155 – 162, 2000). De fleste forslag til en sådan markør har således været fokuseret på anvendelsen af genetisk polymorfisme mellem moderen og fosteret (Tang et al., *Clin. Chem.* **45**: 2033 – 2035, 1999; Pertl et al., *Hum. Genet.* **106**: 45 – 49, 2000). Den nærværende

demonstration af epigenetiske markørers mulighed for føtal DNA-detektion i maternelt plasma åbner op for en ny fremgangsmåde til udvikling af en kønsuafhængig og polymorfisme-uafhængig, føtal markør i maternelt plasma. Én måde, hvor dette kan opnås på, er at udnytte fænomenet vævsspecifik methylering (Grunau et al., Hum. Mol. Genet. **9**: 2651 – 2663, 2000). Da trofoblasten har været foreslået at være den fremherskende cellepopulation til frigivelse af føtalt DNA ud i maternelt plasma, muliggør belysningen af de trofoblast-specifikke methyleringsmønstre udviklingen af en generisk, epigenetisk, føtal markør i maternelt plasma. Biologisk set kan anvendelsen af vævsspecifikke methyleringsmarkører også muliggøre, at man direkte adresserer spørgsmålet til hvilke føtale celletyper, som er ansvarlige for frigivelse af føtalt DNA ud i maternelt plasma.

Den epigenetiske analyse af maternelt plasma har indlysende anvendelser til lidelser, som er associeret med genom imprinting, såsom Prader-Willi's syndrom (Pfeiffer, Lancet **356**: 1819 – 1820, 2000). Denne strategi kan også have diagnostisk potentiale for lidelser, såsom præeklampsi, hvor imprintede gener er antaget at spille en rolle (Graves, Reprod. Fert. Dev. **10**: 23 – 29, 1998).

Den mulige anvendelse af føtalt DNA i maternelt plasma til den prænatale detektion af føtale, kromosomale aneuploidiseringer er et emne, som er blevet ivrigt diskuteret siden opdagelsen af dette fænomen (Lo et al., Lancet **350**: 485 – 487, 1997; Bianchi, Am. J. Hum. Genet. **62**: 763 – 764, 1998). Det fund, at kvantitative forskelle mellem de cirkulerende, føtale DNA-koncentrationer ved aneuploide sammenlignet med euploide graviditeter (Lo et al., Clin. Chem. **45**: 1747 – 1751, 1999; Zhong et al., Prenat. Diagn. **20**: 795 – 798, 2000) muliggør en fremgangsmåde til estimering af risikoen for føtalkromosomale aneuploidiseringer fra maternelt plasma. Den nyere opdagelse af apoptotiske, føtale celler i maternelt plasma ("plasma-afledte celler") (Van Wijk et al., Clin. Chem. **46**: 729 – 731, 2000) giver endnu en anden fremgangsmåde til detektion af aneuploidisering fra maternelt plasma (Poon et al., Lancet **356**: 1819 – 1820, 2000). Det er interessant, at de foreliggende data åbner op for endnu en anden mulig fremgangsmåde til detektion af føtalkromosomale aneuploidiseringer. Dette er

baseret på den observation, at afvigende DNA-methyleringsmønstre kan være associeret med kromosomal aneuploidisering (Kuromitsu et al., Mol. Cell Biol. **17**: 707 – 712, 1997; Yu et al., PNAS USA **94**: 6862 – 6867, 1997). Dermed er det muligt at udvikle epigenetiske markører til detektion af sådanne afvigende

5 methylerede, føtale DNA-sekvenser fra maternelt plasma. Sådanne markører tilvejebringer specificitet sammenlignet med en simpel kvantificering af føtalt DNA i maternelt plasma (Lo et al., Clin. Chem. **45**: 1747 – 1751, 1999; Zhong et al., Prenat. Diagn. **20**: 795 – 798, 2000) og bedre egnethed til storskalaanvendelse sammenlignet med de fremgangsmåder, som er baseret på "plasma-

10 afledt celler" (Poon et al., Lancet **356**: 1819 – 1820, 2000).

Der kan også anvendes føtale, epigenetiske markører ved analyse af føtale celler, som er isoleret fra den cellulære fraktion af maternelt blod. Dette drager fordel af nyere data, som viser, at methyleringsanalyserne kunne udføres på en *in situ*-måde (Nuovo et al., PNAS USA **96**: 12754 – 12759, 1999).

15

Med den nyere erkendelse af, at føtomaternel-trafik er en bidirektionel proces (Lo et al., Blood **88**: 4390 – 4395, 1996; Maloney et al., J. Clin. Invest. **104**: 41 – 47, 1999), kan epigenetiske markører også anvendes til at undersøge cellulær

20 og DNA-overførsel fra moderen til fosteret. En sådan fremgangsmåde kunnen også have anvendelser ved undersøgelse af andre typer kimærisme, såsom hæmopoietisk post-transplantationskimærisme (Starzl et al., Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. **6**: 292 – 298, 1997) og urinær DNA-kimærisme (Zhang et al., Clin. Chem. **45**: 1741 – 1746, 1999).

25

Med vores øgede forståelse af de HT-række-baserede teknologier for methyleringsanalyse (Yan et al., Clin. Cancer Res. **6**: 1432 – 1438, 2000) forventer vi, at antallet af anvendelige, føtale, epigenetiske markører vil stige hurtigt over de næste få år. En sådan udvikling vil tilvejebringe et klinisk relevant felt af føtale,

30 epigenetiske markører, som kan anvendes på en synergistisk måde med traditionelle genetiske markører i maternelt plasma.

SEKVENSLISTE

- 5 <110> The Chinese University of Hong Kong
 Lo, Yuk Ming Dennis
 Poon, Lit Man
- <120> Fremgangsmåder til detektion af DNA, som stammer fra forskellige individer
- 10 <130> CMD/FP6090815
- <140> PCT/GB02/03941
 <141> 2002-08-30
- 15 <150> US 09/944.951
 <151> 2001-08-31
- <160> 11
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
- 25 <213> Kunstig sekvens
- <220>
 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: methyleret androgen receptorgensekvens
- 30 methyleringsspecifik PCR- (MSP) –primer M-for
- <400> 1
 gcgagcgtag tatttttcgg c 21
- 35 <210> 2
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens
- 40 <220>
 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: methyleret androgen receptorgensekvens
- methyleringsspecifik PCR- (MSP) –primer M-rev
- 45 <400> 2
 aaccaataaa cctataaaac ctctacg 27
- <210> 3
 <211> 24

- <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens
- <220>
 5 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: methyleret androgen receptorgensekvens
 methyleringsspecifik PCR- (MSP) –primer U-for
- <400> 3
 10 gtgtgagtg tagtatttt tgg 24
- <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> Kunstig sekvens
- <220>
 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: methyleret androgen receptorgensekvens
 20 methyleringsspecifik PCR- (MSP) –primer U-rev
- <400> 4
 caaataacct etaaaacctc taca 24
- 25 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens
- 30 <220>
 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: enkeltnucleotid-polymorfisme (SNP) inden i differentielt methyleret region (DMR) i den humane IGF2-H19-region, PCR-amplifikation, fremadrettet primer
- 35 <400> 5
 ggacggaatt ggtgtagt 20
- <210> 6
 <211> 21
 40 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

- <220>
 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: enkeltnucleotid-polymorfisme (SNP) inden i differentielt methyleret region (DMR) i den humane IGF2-H19-region, PCR-amplifikation, revers primer
- 5
 <400> 6
 aggcaattgt cagttcagta a 21
- <210> 7
 10 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens
- <220>
 15 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: enkeltnucleotid-polymorfisme- (SNP) -sted inden i differentielt methyleret region i den humane IGF2-H19-region, methyleret allel methyleringsspecifik PCR (MSP) fremadrettet primer M-for
- 20 <400> 7
 ttaattgggg ttcggtcg 18
- <210> 8
 <211> 23
 25 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens
- <220>
 30 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: enkeltnucleotid-polymorfisme- (SNP) -sted inden i differentielt methyleret region i den humane IGF2-H19-region, methyleret allel methyleringsspecifik PCR (MSP) fremadrettet primer M-rev
- <400> 8
 35 ccggaacctaa aaatctaata cga 23
- <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 40 <213> Kunstig sekvens
- <220>
 45 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: enkeltnucleotid-polymorfisme- (SNP) -sted inden i differentielt methyleret region i den humane IGF2-H19-region, methyleret allel methyleringsspecifik PCR (MSP) fremadrettet primer U-for
- <400> 9

ggttgttg tggaatgtt tt 22

- 5 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

- 10 <220>
 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: enkeltnucleotid-polymorfisme- (SNP)
 -sted inden i differentielt methyleret region i den humane IGF2-H19-
 region, methyleret allel methyleringsspecifik PCR (MSP) fremadrettet
 primer U-rev

- 15 <400> 10
 cccaacctaa aaatctaata caa 23

- 20 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

- 25 <220>
 <223> Beskrivelse af kunstig sekvens: primerforlængelsesassay, Cys-5-
 mærket primer

- <400> 11
 gggttattg ggaataggat attta 25

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til at skelne DNA-typer, der stammer fra celler fra forskellige individer, hvor DNA-typerne er til stede i en biologisk prøve, som er opnået
5 fra ét af individerne, hvilken fremgangsmåde omfatter trinene at detektere en metyleringsforskel mellem DNA-typerne fra de forskellige individer.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved den biologiske prøve er en væskeformig eller cellulær prøve eller en blanding deraf.
10
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved den biologiske prøve er plasma eller serum.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved den biologiske prøve er blod.
15
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved ét af individerne er en gravid kvinde, og det andet individ er et ufødt foster.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved ét af individerne er en transplantationsmodtager, og det andet individ er en organdonor.
20
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, hvorved transplantationen er en knoglemarvstransplantation.
- 25 8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, der yderligere omfatter trinene at måle koncentrationen af DNA-typen.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, der yderligere omfatter trinene at sætte natriumbisulfid til den biologiske prøve eller til DNA-typen.
30
10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, der yderligere omfatter trinene at udføre en metylerings-specifik polymerasekædereaktion.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, der yderligere omfatter trinnet at amplificere DNA-typerne til frembringelse af et PCR-produkt samt sekventering af PCR-produktet.
- 5 12. Fremgangsmåde ifølge krav 1, der yderligere omfatter trinnet at udføre primerforlængelse.
13. Fremgangsmåde ifølge krav 5, hvorved den biologiske prøve er maternelt plasma eller serum.
- 10 14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, der yderligere omfatter trinnet at måle koncentrationen af føtal DNA i maternelt plasma eller serum.
- 15 15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, hvorved koncentrationen af det målte, føtale DNA anvendes til at forudsige, overvåge eller diagnosticere eller prognosticere en lidelse.
16. Fremgangsmåde ifølge krav 5, hvorved methyleringsforskellen er associeret med en føtal eller maternel lidelse.
- 20 17. Fremgangsmåde ifølge krav 16, hvorved lidelsen er en kromosomal aneuploidisering.
- 25 18. Fremgangsmåde ifølge krav 17, hvorved den kromosomale aneuploidisering er trisomi 21 (Down's syndrom).
19. Fremgangsmåde ifølge krav 16, hvorved lidelsen vælges fra gruppen, der består af præeklampsi, en imprintingslidelse, Prader-Willi's syndrom og Angelman's syndrom.
- 30 20. Fremgangsmåde ifølge krav 14, hvorved den i føtale celler detekterede methyleringsforskel anvendes som en føtus-specifik markør.

21. Fremgangsmåde ifølge krav 6, der yderligere omfatter trinnet at måle koncentrationen af organdonor- og transplantationsmodtager-DNA.
22. Fremgangsmåde ifølge krav 21, hvorved koncentrationen af organdonor- og transplantationsmodtager-DNA anvendes til at forudsige transplantationsmodtagelsens kliniske progression.
23. Fremgangsmåden ifølge krav 1, hvorved ét af individerne er en mand, og det andet individ er en kvinde.
24. Fremgangsmåde ifølge krav 23, hvorved methyleringsforskellen detekteres på et inaktiveret X-kromosom fra kvinden.
25. Fremgangsmåde ifølge krav 24, hvorved en methyleret DNA-sekvens på det inaktiverede X-kromosom anvendes til at detektere DNA, som stammer fra kvinden.
26. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved methyleringsforskellen analyseres inden i cellerne.
27. Fremgangsmåde ifølge krav 26, hvorved methyleringsforskellen analyseres ved anvendelse af en *in situ*-methylerings-specifik polymerasekædereaktion.
28. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved methyleringsforskellen anvendes til at sortere eller isolere celler fra individerne eller anvendes til at oprense DNA fra individerne.
29. Fremgangsmåde ifølge krav 5, hvorved methyleringsforskellen detekteres i føtale celler i placenta.
30. Anvendelse af et kit til af skelne DNA-typer, som stammer fra celler fra forskellige individer, hvor DNA-typerne er til stede i en biologisk prøve, som er

opnåelig fra ét af individerne, hvilket kit omfatter én eller flere reagenser til fastlæggelse af en DNA-types metyleringsstatus.

5 31. Anvendelse ifølge krav 30, hvor reagentet til fastlæggelse af metyleringsstatus er natriumbisulfit.

32. Anvendelse ifølge krav 30, der yderligere omfatter ét eller flere reagenser til detektion af tilstedeværelsen af DNA.

10 33. Anvendelse ifølge krav 30, der yderligere omfatter ét eller flere reagenser til amplificering af i den biologiske prøve tilstedeværende DNA.

34. Anvendelse ifølge krav 30, der yderligere omfatter ét eller flere apparater til opnåelse af en DNA-prøve.

15

Fig. 1A.

Kontroller

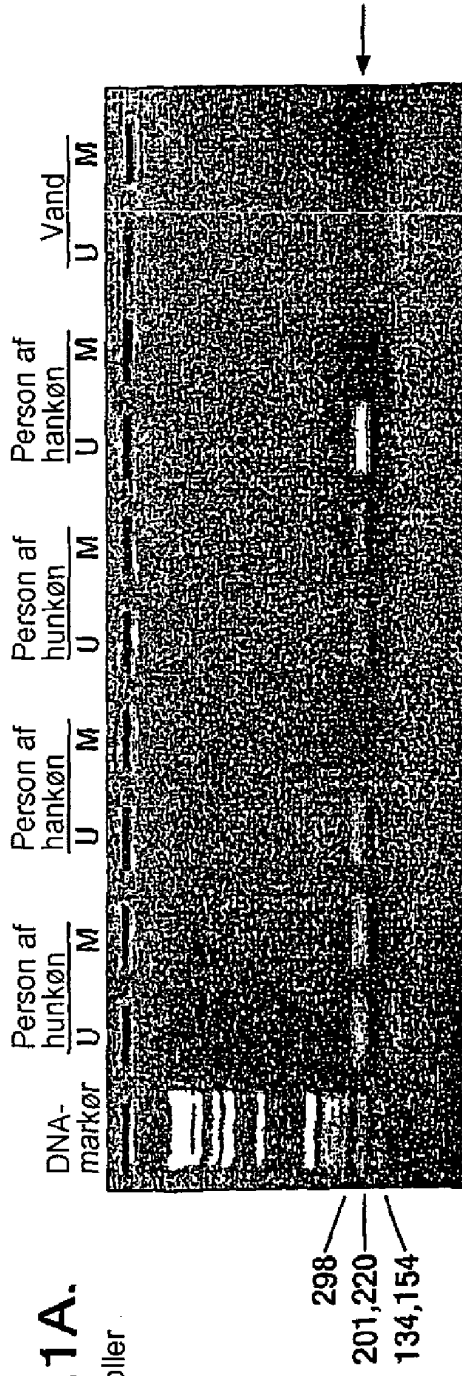


Fig. 1B.

Modtagere

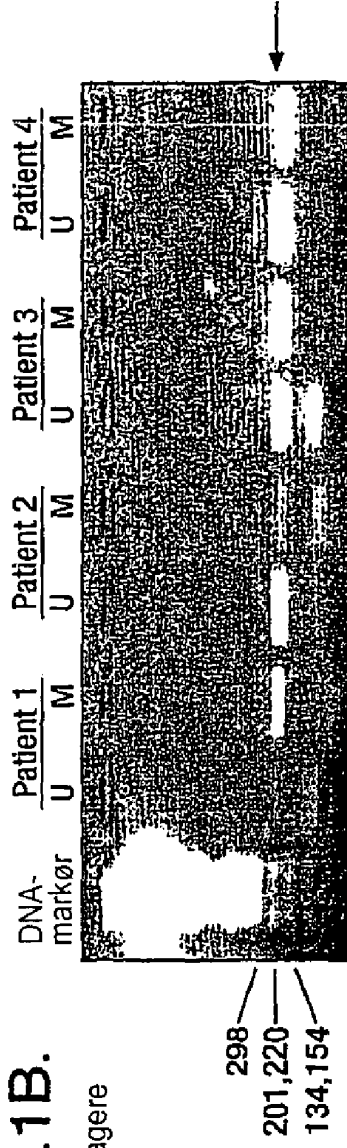
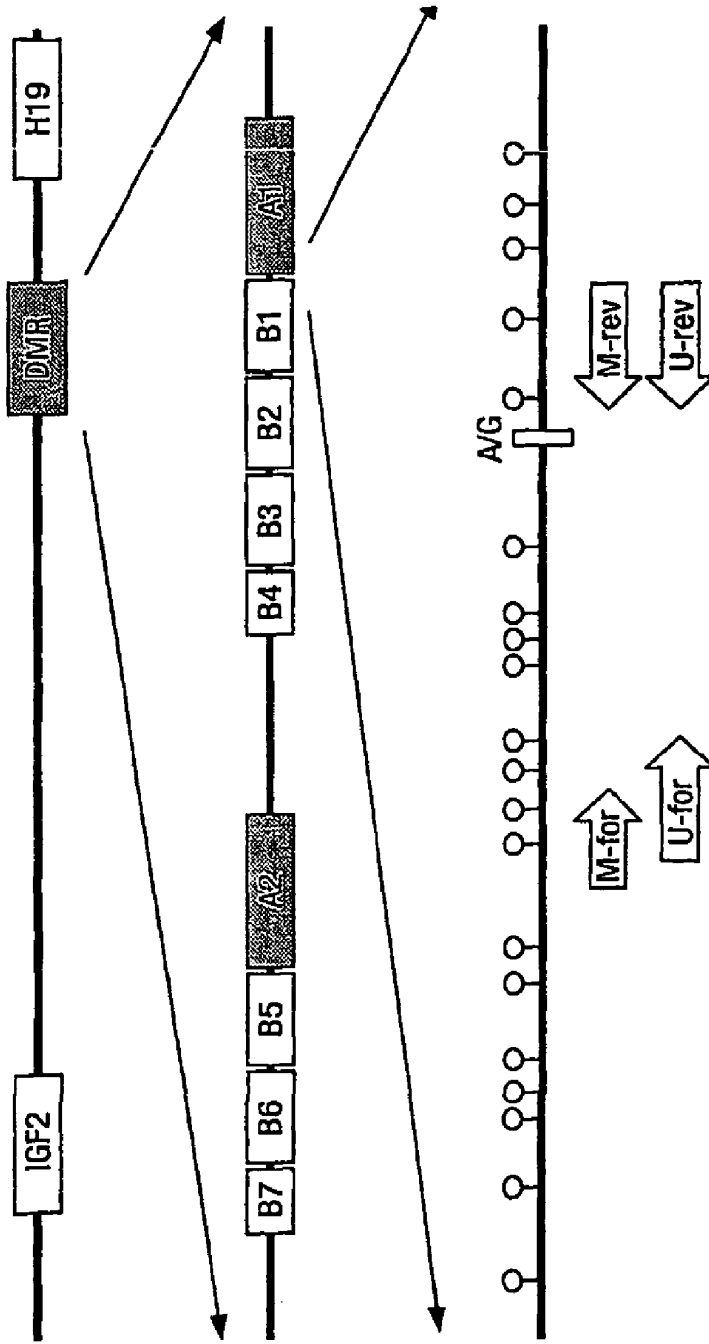


Fig.2.



M-for: 5'-TTAAATGGGGTTGGTTCG-3'
M-rev: 5'-CCCGACCTAAAATCTAATACGA-3'
U-for: 5'-CGTTTGTGTGGAAATGTTT-3'
U-rev: 5'-CCCAACCTAAAATCTAATACAA-3'

Fig.3A.

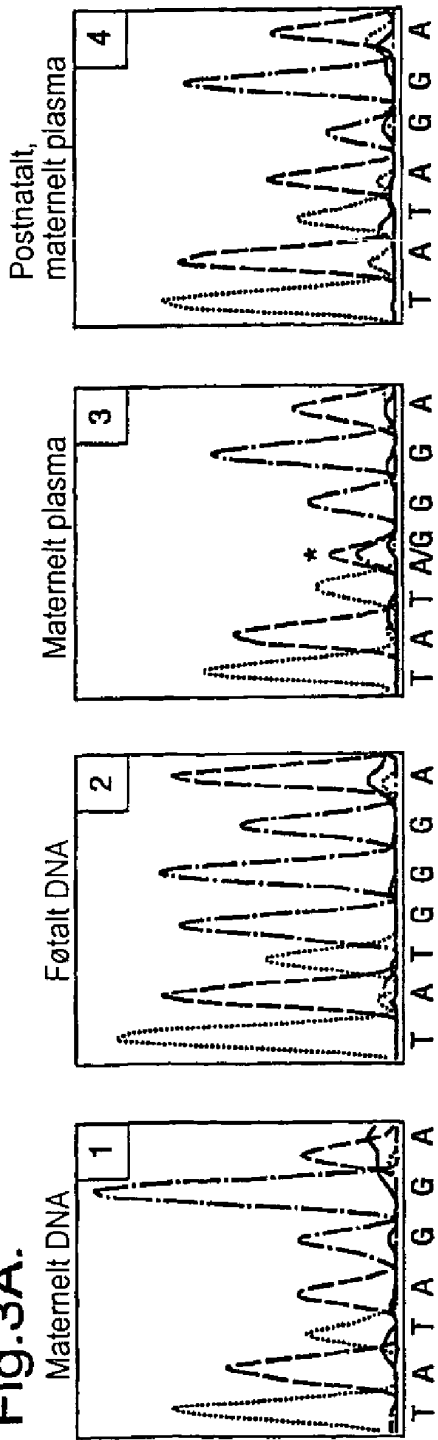


Fig.3B.

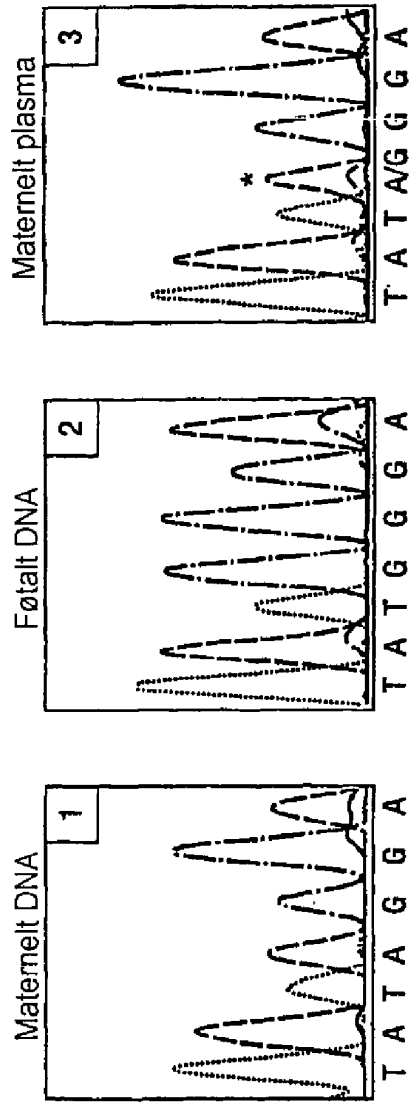


Fig.4A.

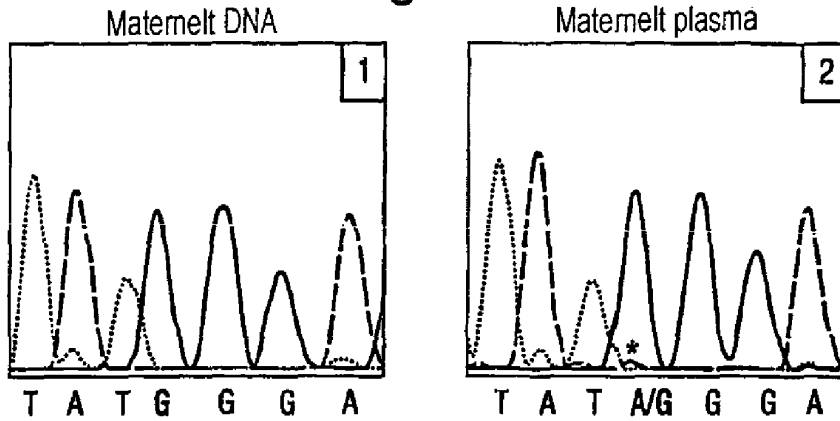


Fig.4b.

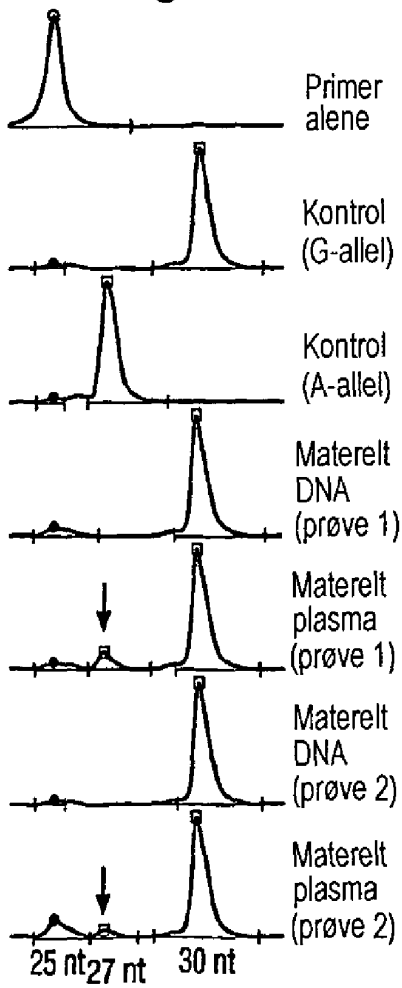


Fig.4c.

