



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 562**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02758554 .6**

86 Fecha de presentación : **30.08.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1421211**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **Procedimiento para detectar DNA originario de diferentes individuos.**

30 Prioridad: **31.08.2001 US 944951**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **The Chinese University of Hong Kong  
Room 226, Pi Ch'lu Building  
Shatin, New Territories  
Hong Kong SAR, CN**

72 Inventor/es: **Lo, Yuk Ming Dennis y  
Poon, Lit Man**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

**ES 2 280 562 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

Procedimientos para detectar DNA originario de diferentes individuos.

5 **Antecedentes de la invención**

La presencia de DNA originario de diferentes individuos en los fluidos del cuerpo es un fenómeno biológico bien conocido en muchos escenarios clínicos y biológicos. Por ejemplo, después de un trasplante de médula ósea, el sistema hemopoiético del receptor del trasplante estará constituido por proporciones variables de células del donante y el receptor. La estimación de la cantidad de células del donante o el receptor se ha realizado por detección de diferencias genéticas entre el donante y el receptor, incluidos polimorfismos de género (Mangioni y otros, Bone Marrow Transplant 20:969-73(1997)) y DNA (Roux y otros, Blood 79:2775-83 (1992)). El corolario de este enfoque es que, si la región analizada no presenta una diferencia genética entre el donante y el receptor, no será posible el análisis por el enfoque actual.

En otro ejemplo, durante el embarazo, se ha demostrado anteriormente la detección de DNA fetal en plasma y suero maternos (Lo y otros, Lancet 350:9072:485-7 (1997)). Esta tecnología ha demostrado que el DNA fetal aislado de plasma y suero maternos se puede usar para el diagnóstico prenatal no invasivo (Lo y otros, N. Eng. J. Med. 339 (24):1734-8 (1998); Faas y otros, Lancet 352(9135):1196 (1998); Amicucci y otros, Clin Chem 46(2):301 (2000); Chen y otros, Prenat Diagn 20(4):355-7 (2000); Saito y otros, Lancet 356:1170 (2000)). La aplicación clínica de este fenómeno ha sido ayudada por las concentraciones absolutas y relativas relativamente altas de tal DNA fetal circulante en plasma y suero materno (Lo y otros, Am. J. Hum Genet 62:768-775 (1998)). Usando este enfoque, se ha conseguido la detección prenatal no invasiva en diferentes afecciones, incluidas el estado D de rhesus fetal (LO y otros, New Eng. J. Med 339:1734-1738 (1998)), distrofia miotónica (Amicucci y otros, Clin Chem 46:301-302 (2000), acondroplasia (Saito y otros, Lancet 356:1170 (2000)) y ciertas translocaciones cromosómicas (Chen y otros, Prenat Diag 20:335-357 (2000); Chen y otros, Clin Chem 47:937-939 (2001)). Todos estos enfoques actuales han utilizado la detección de las secuencias de DNA heredadas del padre y que son genéticamente distinguibles de las de la madre (Bianchi, Am. J. Hum. Genet 62(4):763 (1998)). Específicamente, se ha creído que es imposible la detección del DNA que ha heredado el feto de la madre en el plasma o suero. Se han descrito también limitaciones similares para la detección de células fetales nucleadas de la fracción celular de sangre materna (Lo y otros, Ann NY Acad Sci 731:204 (1994)).

Otros investigadores han detectado DNA metilado aberrantemente de pacientes de cáncer. De esto se ha dado cuenta en pacientes con una variedad de cánceres, incluidos cáncer de pulmón (Esteller y otros, Cancer Res 59(1):67 (1999)) y cáncer de hígado (Wong y otros, Cancer Res 59(1):71 (1999)).

Recientemente se ha prestado un gran interés a la biología de fenómenos epigenéticos, esto es, procesos que alteran el fenotipo pero que no están asociados con cambios en la secuencia de DNA (Wolffe, Science 286:481-486 (1999)). Uno de los procesos epigenéticos mejor caracterizados es la metilación de DNA (Wolffe y otros, Curr Biol. 10:R463-R465 (1999)). Sería muy valioso un procedimiento para discriminar especies de DNA originarias de diferentes individuos en fluidos biológicos usando diferencias epigenéticas más bien que genéticas entre las especies de DNA. Por ejemplo, la detección epigenética de DNA fetal en una muestra materna proporcionaría un avance significativo que permitiría procedimientos adicionales de exploración y diagnósticos.

45 **Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención ofrece procedimientos para diferenciar especies de DNA originarias de diferentes individuos en una muestra preferida. En realizaciones preferentes, los procedimientos de la presente invención se usan para diferenciar o detectar DNA fetal en una muestra materna o para diferenciar DNA de un donante de órgano de DNA de un receptor de un órgano.

Los expertos en la técnica apreciarán que la muestra biológica obtenida de un individuo se puede tomar de cualquier muestra de fluido o células, aunque en realizaciones preferentes, el fluido del cuerpo es suero o plasma. En realizaciones preferentes, las especies de DNA se diferencian por observación de diferencias epigenéticas en las especies de DNA, tales como diferencias en la metilación de DNA. Por ejemplo, en situaciones en las que una especie de DNA procede de un varón y una especie de DNA procede de una mujer, el marcador epigenético puede ser el cromosoma X inactivado de la mujer. En tales realizaciones, para detectar el DNA originario de la mujer individual se pueden usar secuencias del cromosoma X inactivado. En algunas realizaciones, las diferencias epigenéticas se pueden analizar dentro de las células. Además, en algunas realizaciones, las diferencias epigenéticas se pueden analizar usando *in situ* la reacción en cadena de polimerasa específica a metilación. Además, en algunas realizaciones, las diferencias epigenéticas se pueden usar para seleccionar o aislar células de los respectivos individuos o para purificar DNA de los individuos respectivos. Los procedimientos de acuerdo con la presente invención pueden llevarse a la práctica midiendo o sin medir las concentraciones de las especies de DNA, aunque, en realizaciones preferentes, se miden las concentraciones de las especies de DNA con las respectivas diferencias epigenéticas. Esta medida de concentraciones implica medir las diferencias de metilación de DNA respectivas en realizaciones en las que las diferencias de metilación son el marcador epigenético. En realizaciones especialmente preferentes, a la muestra biológica o la especie de DNA se añade directamente bisulfito sódico para detectar las diferencias de metilación de DNA. Sin embargo, en otras realizaciones, para detectar las diferencias de metilación de DNA se puede usar una reacción en cadena de polimerasa

específica para metilación como es bien conocido por los expertos en la técnica. En otras realizaciones, para detectar diferencias de metilación se puede usar la secuenciación de DNA o la extensión del cebador.

5 En un segundo aspecto, la presente invención ofrece procedimientos para detectar anomalías en un feto detectando DNA fetal en una muestra biológica obtenida de una madre. Los procedimientos de acuerdo con la presente invención proporcionan la detección de DNA fetal en una muestra de la madre diferenciando el DNA fetal del DNA materno basándose en marcadores epigenéticos tales como diferencias en la metilación de DNA. Empleando tales procedimientos, se puede identificar un DNA fetal que pronostica una anomalía genética o una enfermedad basada en la genética, con lo que se proporcionan procedimientos para diagnóstico prenatal. Estos procedimientos son aplicables a cualquiera de las afecciones asociadas al embarazo para las que se identifican los cambios de la metilación asociados con un estado de enfermedad. Entre los ejemplos de enfermedades que se pueden diagnosticar están incluidos preeclampsia, una aneuploidía cromosómica, incluidas, pero no únicamente, trisomía 21, síndrome de Prader-Willi y síndrome de Angelman.

15 Como con los procedimientos de diferenciación más extensa del primer aspecto de la invención, preferiblemente, la muestra biológica obtenida de la madre es plasma o suero. La diferenciación entre DNA fetal y materno se puede realizar cuantificando o sin cuantificar la concentración de DNA fetal en el plasma o suero materno. En realizaciones en las que se cuantifica el DNA fetal, se puede usar la concentración medida para predecir, controlar, o diagnosticar o pronosticar un trastorno asociado con el embarazo. En realizaciones preferentes, la marca epigenética particular derivada del feto está asociada con un trastorno fetal y, en algunas realizaciones, como marcador específico del feto en plasma o suero materno se usa una característica epigenética de las células fetales en la placenta.

25 En un tercer aspecto, la presente invención ofrece procedimientos para diferenciar una especie de DNA originaria de un donante de órgano de la de un receptor del órgano. Como con los procedimientos de diferenciación más extensa del primer aspecto de la invención, preferiblemente, la muestra biológica obtenida es plasma o suero. La diferenciación entre DNA del donante del órgano y el receptor del órgano, o potencial donante del órgano y potencial receptor del órgano, se puede realizar cuantificando o sin cuantificar la concentración de DNA en la muestra biológica. Esta realización es particularmente útil en casos en los que el trasplante es un trasplante de médula ósea. Tales medidas se pueden usar para predecir el progreso clínico del receptor del trasplante, en especial en lo referente a rechazo del órgano.

35 En un cuarto aspecto, la presente invención ofrece kits para diferenciar especies de DNA originarias de diferentes individuos en una muestra biológica. Tales kits son útiles para, por ejemplo, diferenciar o detectar la presencia de DNA fetal en una muestra de material biológico o para diferenciar DNA de un donante de un órgano, o un potencial donante de un órgano, del DNA de un receptor de un órgano o potencial receptor de un órgano. Los kits de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más reactivos para estimar el estado de metilación del DNA materno, tales como bisulfito sódico, y uno o más reactivos para detectar la presencia de DNA, tales como un gel. Adicionalmente, tales kits pueden incluir uno o varios reactivos para amplificar la cantidad de DNA presente en la muestra, tales como un reactivo o varios reactivos para realizar la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa. Tales reactivos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, los kits pueden incluir uno o más aparatos para obtener una muestra de DNA materno. Tales aparatos son bien conocidos por los expertos en la técnica. En particular, los kits de acuerdo con la invención se pueden usar para diagnosticar una enfermedad causada totalmente o en parte por una anomalía genética tal como una mutación, sustitución o supresión total o parcial de una secuencia de DNA presente en un feto. Entre los ejemplos de enfermedad que se pueden diagnosticar están incluidas preeclampsia, una aneuploidía cromosómica, incluidos, pero no únicamente, trisomía 21, síndrome de Prader-Willi y síndrome de Angelman.

### Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 presenta los resultados de un ensayo que detecta secuencias de DNA metilado y no metilado del gen de receptor andrógeno. En total se reclutaron 6 varones sanos y 5 mujeres sanas. De todos los sujetos de control masculinos sólo se detectó en estas muestras el gen receptor andrógeno no metilado, como era de esperar (Fig. 1A). A diferencia, en los sujetos de control femeninos se observaron secuencias de DNA del gen receptor andrógeno tanto no metilado como metilado (Fig. 1A). Los grados de detección de genes de receptor andrógenos metilado y no metilado en estos sujetos femeninos fueron 100% y 82%, respectivamente. Cuando en el ensayo se omitieron muestras de DNA, no se observó señal positiva (Fig. 1A). Es interesante que en todos los receptores de trasplante de médula ósea con donantes femeninos se observaron señales positivas para secuencias de DNA metilado y no metilado, lo que indica que en la sangre en circulación de receptores varones existen células de donante femenino.

60 La Fig. 2 proporciona una representación esquemática de la región metilada diferencialmente (DMR) de la región IGF2-H19 humana. Se muestran las dos unidades de 450-bp repetidas (A1 y A2) y siete de 400-bp repetidas (B1-B7). Los sitios potenciales de metilación del DNA de la cadena superior de la región estudiada se representan por círculos abiertos. El sitio de polimorfismo de nucleótido individual (SNP) (A/G) se indica con una caja abierta. Las flechas abiertas representan la posición de los cebadores de avance (for) e inverso (rev) en reacciones PCR específicas para alelos metilados (M) y no metilados (U), respectivamente. Se presentan las secuencias de estos cebadores MSP. Las diferencias de secuencia entre DNA tratado con bisulfito y DNA no tratado se destacan en cursivas en negrita y las diferencias entre DNA metilado (heredado del padre) y no metilado (heredado de la madre) se subrayan en negritas.

La Figura 3 representa la detección de DNA metilado (paterno) en el tercer trimestre (A) y plasma materno en el segundo trimestre (B). Se representan la secuencia de DNA de alelos metilados en muestras de revestimiento anteedo materno (panel 1), revestimiento anteedo o fluido amniótico (panel 2), plasma materno prenatal (panel 3) y plasma materno posnatal (panel 4). La presencia de DNA fetal metilado en la muestra de plasma materno prenatal se indica con \*. El sitio polimórfico se indica en letras rojas.

La Fig. 4 representa la detección de DNA fetal no metilado (heredado de la madre) en plasma materno. (a) Se detectaron secuencias de DNA no metilado en revestimiento antelado materno (panel 1) y una muestra materna del tercer trimestre (panel 2) usando secuenciación directa. La presencia de DNA fetal no metilado en la muestra de plasma materno prenatal se indica con \*. (b) Se detectó DNA fetal no metilado (flecha) en dos muestras de plasma materno del tercer trimestre usando el ensayo de extensión de cebador. (c) Se detectó DNA fetal no metilado (flecha) en una muestra de plasma materna del segundo trimestre usando el ensayo de extensión de cebador. Se muestran productos de las reacciones de control que contenían sólo cebador, alelo G no metilado o alelo A no metilado. Los tamaños (nt) de los productos de reacción se presentan en la base. ● cebador no usado; □ alelo detectado.

### Descripción de las realizaciones específicas

En un primer aspecto, la presente invención ofrece procedimientos para diferenciar especies de DNA originarias de diferentes individuos en una muestra biológica. En realizaciones preferentes, los procedimientos de la presente invención se usan para diferenciar o detectar DNA fetal en una muestra materna o para diferenciar DNA de un donante de un órgano del DNA de un receptor de un órgano.

Los expertos en la técnica apreciarán que la muestra biológica de un individuo se puede tomar de una muestra cualquiera de un fluido o células, aunque en realizaciones preferentes, el fluido corporal es plasma o suero. En realizaciones preferentes, las especies de DNA se diferencian por observación de diferencias epigenéticas en las especies de DNA, tales como diferencias de metilación. Por ejemplo, en situaciones en las que una especie de DNA viene de un varón y una especie de DNA viene de una mujer, el marcador epigenético puede ser el cromosoma X inactivado de la mujer. En tales realizaciones, para detectar el DNA originario de la mujer se pueden usar secuencias de DNA metilado en el cromosoma X inactivado. En algunas realizaciones, se pueden analizar diferencias epigenéticas dentro de las células. Además, en algunas realizaciones, las diferencias epigenéticas se pueden analizar usando reacción en cadena de polimerasa específica para la metilación *in situ*. Adicionalmente, las diferencias epigenéticas se pueden usar para escoger o aislar células de los respectivos individuos o para purificar DNA de los respectivos individuos. Los procedimientos de acuerdo con la presente invención se pueden practicar midiendo o sin medir las concentraciones de las especies de DNA, aunque en realizaciones preferentes se miden las concentraciones de las especies de DNA con las respectivas diferencias epigenéticas. Esta medida de las concentraciones implica medir las respectivas diferencias de metilación del DNA en realizaciones en las que las diferencias de metilación del DNA son el marcador epigenético. En realizaciones especialmente preferentes, a la muestra biológica o la especie de DNA se añade directamente bisulfito sódico para detectar diferencias de la metilación de DNA. En otras realizaciones, sin embargo, para detectar diferencias de metilación se puede usar una reacción en cadena de polimerasa específica para metilación, que es bien conocida por los expertos en la técnica. En otras realizaciones más, para detectar diferencias de metilación se puede usar la secuenciación de DNA o la extensión de cebador.

Tal como en esta memoria, el término “muestra biológica” abarca cualquier muestra de flujo o celular, o mezcla de ellos, obtenida de un organismo vivo. Específicamente, el término incluye muestras de biopsias de tejidos, suero, plasma o fluido amniótico.

Tal como se usa en esta memoria, el término “diferencia epigenética” abarca cualquier diferencia molecular o estructural que no sea la secuencia primaria de nucleótido. Por ejemplo, esto puede incluir diferencias en metilación.

Tal como se usa en esta memoria, el término “DNA” abarca cualquier secuencia de más de un nucleótido, tal como secuencias de polinucleótidos, fragmentos de gen y genes completos. Tal como se usa en esta memoria, el término “PCR específica para metilación” se usa para describir un procedimiento en el que el DNA se trata con bisulfito sódico y luego se somete a amplificación por PCR. Esta técnica está basada en el principio de que el tratamiento con bisulfito da por resultado la conversión de restos de citosina no metilada en uracilo. Los restos de citosina no metilada, por otra parte, permanecen intactos. Así, las secuencias de DNA de regiones genómicas metiladas y no metiladas que siguen a la conversión con bisulfito son diferentes y distinguibles por cebadores de PCR específicos para las secuencias.

La presente invención utiliza el fenómeno de impresión genómica para eludir las limitaciones de la técnica anterior. En la impresión genómica, las secuencias de DNA se modifican bioquímicamente sin alterar la secuencia de DNA. Si este proceso da por resultado la modificación diferencial del DNA fetal y el materno, esta diferencia se puede aprovechar para la discriminación del DNA fetal y el materno en plasma y suero materno. Este fenómeno se puede usar también para la discriminación de células fetales de células maternas en la fracción celular de sangre materna. Además, este principio se puede usar también para detectar células maternas o DNA que ha entrado en el cuerpo del feto (Lo y otros, *Bood* 88(11): 4390-5 (1996); Lo y otros, *Clin. Chem.* 46(9):1301-9 (2000); Maloney y otros, *J. Clin. Invest.* 104(1):41-7 (1999)). Este fenómeno se puede usar también en muchos otros escenarios en los que se encuentra que están presentes células o secuencias de DNA dentro del cuerpo de un individuo, como es el caso después de un trasplante de médula ósea (Lo y otros, *Br J Haematol* 89(3):645-9 (1995)) o trasplante de un órgano sólido (Starzl y

otros, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6(3):292-8 (1997); Lo y otros, *Lancet* 351(9112):1329-30 (1998); Zhang, *Clin Chem* 45(10):1741-6 (1999).

5 La presente invención permite el desarrollo de un marcador para DNA fetal en plasma/suero materno independiente del género e independiente del polimorfismo. Para desarrollar un marcador fetal independiente del género e independiente del polimorfismo se pueden usar secuencias de DNA que son metiladas preferente y específicamente en los trofoblastos (Ohgane y otros, *Dev Genet.* 22(2):132:40 (1998)). Este elude la limitación actual que sólo puede detectar fácilmente la presencia de DNA de un feto masculino en el plasma/suero de la madre (usando como diana el cromosoma Y) (Lo y otros, *Am. J Hum Genet.* 62(4):768 (1998)). Proporciona procedimientos de detección separados de los basados en diferencias de secuencias en DNA fetal y materno para hacer tal distinción (Tang y otros, *Clin Chem* 45(11):2033-5 (1999); Pertl y otros, *Hum Genet* 106:45-49 (2000)).

15 El desarrollo de procedimientos moleculares de detección tales como PCR ha proporcionado herramientas poderosas para controlar el quimerismo que sigue al trasplante de médula ósea (BMT). Uno de los ensayos basados en PCR más ampliamente utilizados para la detección del quimerismo después de BMT en casos de desajuste de sexo es la PCR para secuencias en el cromosoma Y (Lo y otros, *Br J Haematol* 89:645-9 (1995)). La limitación de esta estrategia es que sólo se puede usar en los casos en que el donante es un varón y el receptor es una mujer. La presente invención proporciona un sistema que se puede aplicar a situaciones en las que el donante es una mujer y el receptor es un hombre. El hecho de que el fenómeno de la lionización sólo se da en hembras se puede explotar para desarrollar un marcador específico para la mujer. En este fenómeno, uno de los dos cromosomas X de una mujer se inactiva al azar, habiendo metilación de genes inactivados. Esto permite por tanto un ensayo para detectar DNA de mujer en un exceso de DNA de hombre y que se puede aplicar a BMT con donantes mujer y receptores hombre.

25 En un segundo aspecto, la presente invención ofrece procedimientos para detectar anomalías en un feto detectando DNA fetal en una muestra biológica obtenida de una madre. Los procedimientos de acuerdo con la presente invención permiten detectar DNA fetal en una muestra materna diferenciando el DNA fetal del DNA materno basándose en marcadores epigenéticos tales como diferencias en la metilación de DNA. Empleando tales procedimientos, se puede identificar DNA fetal que pronostica una anomalía o una enfermedad, lo que proporciona procedimientos para el diagnóstico prenatal. Estos procedimientos son aplicables a cualquiera de y a todas las afecciones para las que se identifican cambios asociados a un estado de enfermedad. Son ejemplos de enfermedades que se pueden identificar, preeclampsia, aneuploidía cromosómica, incluida, aunque no únicamente, trisomía 21, el síndrome de Prader-Willi y el síndrome de Angelman.

35 Como los procedimientos de amplia diferenciación del primer aspecto de la invención, la muestra biológica obtenida de la madre preferiblemente es plasma o suero. La diferenciación entre DNA fetal y DNA materno se puede realizar cuantificando o sin cuantificar la concentración de DNA fetal en el plasma o suero materno. En realizaciones en las que se cuantifica DNA fetal, se puede usar la concentración medida para predecir, controlar o diagnosticar un trastorno asociado con el embarazo. En realizaciones preferentes, la marca epigenética particular derivada del feto se asocia con un trastorno fetal y, en algunas realizaciones, una característica epigenética fetal en células fetales de la placenta se usa como marcador específico del feto en plasma o suero materno.

45 La presente invención utiliza secuencias de DNA fetal metilado diferencialmente, que no es necesario que sean distinguibles en cuanto a la secuencia de DNA del DNA materno, como marcadores para diagnóstico prenatal no invasivo. Este nuevo enfoque puede convertir pares feto-madre que no son informativos en el enfoque convencional, en informativos para diagnóstico prenatal. Así, la presente invención proporciona una plataforma sobre la cual se puede construir una nueva generación de ensayos prenatales no invasivos.

50 Los procedimientos de la presente invención están basados en la detección de DNA metilado diferencialmente de origen fetal del plasma o suero de mujeres embarazadas. Las secuencias de DNA metilado diferencialmente, que pueden contener polimorfismo de un nucleótido individual, se detectan preferiblemente por reacción en cadena de polimerasa (PCR) específica para metilación; pero, en principio, se puede usar cualquier procedimiento de detección para metilar DNA diferencialmente. Este enfoque permite el uso de marcadores convencionales que no informan sobre DNA para diagnósticos prenatales.

55 La presente invención permite detectar o predecir la presencia de cualesquier trastornos del feto o de la madre que están asociados con un cambio en el estado de metilación de una secuencia de DNA. Entre los ejemplos están incluidos trastornos tales como el síndrome de Prader-Wili (Kubota y otros, *Nat. Genet* 16(1):16-7 (1997)). La presente invención proporciona un nuevo tipo de ensayo para la preeclampsia que ha sido sugerido que es un trastorno de impresión (Graves, *Reprod Fétil Dev* 10(1):23-9 (1998)). La presente invención proporciona además un nuevo tipo de ensayo para aneuploidias cromosómicas, incluido el síndrome de Down (trisomía 21), que se puede asociar con cambios de metilación (Yu y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* 94(13):6862-7 (1997)).

65 La presente invención ofrece diferencias de metilación de DNA entre la madre y el feto superando así las limitaciones de la técnica anterior en la detección de DNA fetal en plasma materno.

En un tercer aspecto, la presente invención ofrece procedimientos para diferenciar la especie de DNA originaria de un donante de un órgano y la de un receptor de un órgano. Como con los procedimientos de amplia diferenciación del primer aspecto de la invención, preferiblemente, la muestra biológica se obtiene de plasma o suero. La diferenciación

entre el DNA del órgano del donante y el del receptor del órgano, o del potencial donante y del potencial receptor, puede realizarse cuantificando o sin cuantificar la concentración de DNA en la muestra biológica. Esta realización es particularmente útil en casos de trasplante de médula ósea. Se pueden usar tales medidas para predecir el progreso clínico del receptor del trasplante, en especial en cuanto al rechazo del órgano aplicado.

5 En un cuarto aspecto, la presente invención ofrece kits para diferencias especies de DNA originarias de diferentes individuos en una muestra biológica. Tales kits son útiles, por ejemplo, para diferenciar o detectar la presencia de DNA fetal en una muestra biológica materna, o para diferenciar DNA de un donante, o potencial donante de un órgano, del de un receptor o potencial receptor de un órgano. Los kits de acuerdo con la invención comprenden un reactivo o 10 varios reactivos para comprobar el estado de metilación del DNA materno, tales como bisulfito sódico, y un reactivo o varios para detectar la presencia de DNA, tales como un gel. Adicionalmente, tales kits pueden incluir un reactivo o varios para amplificar la cantidad de DNA presente en la muestra, tales como un reactivo o varios para realizar la amplificación por reacción en cadena de polimerasa. Tales reactivos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, tales kits pueden incluir un aparato o varios para obtener una muestra de DNA materno. Tales aparatos 15 son bien conocidos por los expertos en la técnica. En particular, los kits de acuerdo con la invención se pueden usar para diagnosticar una enfermedad causada total o parcialmente por una anomalía genética tal como una mutación, sustitución o supresión o duplicación en la totalidad o en parte de una secuencia de DNA presente en un feto. Entre los ejemplos de enfermedades que se pueden diagnosticar están incluidas, aunque no únicamente, preeclampsia, una aneuploidía cromosómica, en la que está incluida trisomía 21, síndrome de Prader-Willi y síndrome de Angelman y 20 otros.

#### Ejemplo 1

##### *Enfoque epigenético de la detección de quimerismo después de trasplante de médula ósea*

#### 25 *Materiales y procedimientos*

##### *Sujetos y muestras*

30 En este estudio se reclutaron cuatro hombres receptores de trasplante de médula, que recibieron el trasplante de donantes femeninas, y 17 sujetos de salud normal. Se cosechó revestimiento antelado (BC) de todas las muestras de sangre-EDTA reclutadas y se almacenaron a -20°C como se ha descrito (Lo y otros, Am J. Hum Genet 62:768-75 (1998)).

##### 35 *Aislamiento de DNA*

Se extrajo DNA del BC usando un kit de extracción de DNA Nucleon (Scotlabs) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

##### 40 *Conversión con bisulfito*

La modificación de muestras de DNA con bisulfito se realizó usando un kit de modificación de DNA CpGenome (Intergen) conforme a las instrucciones del fabricante. Con la conversión con bisulfito, los restos no metilados de citosina se convierten en uracilo mientras que los restos no metilados de uracina permanecen sin cambiar (Herman y 45 otros, Proc Natl Acad Sci USA 93:9821-6 (1996)). La diferencia de secuencias entre DNA metilado y no metilado después de la conversión se distingue usando diferentes cebadores de PCR. Se usó 1 µg de BC DNA en una reacción de conversión con bisulfito.

##### *PCR específica para metilación (MSP)*

50 Se modificaron los ensayos de MSP del protocolo según lo describen Herman y otros, véase *supra*. Se diseñaron los cebadores M para (5'-GCGAGCGTAGTATTTTTTCGGC-3') y M-rev (5'-AACCAAATAACCTATAAAACCTC TACG-3') para la secuencia metilada, mientras que los cebadores U-for (5-GTTGTGAGTGAGTATTTTTTGGT-3') y U-rev (5'-CAAATAACCTATAAAACCTCTACA-3') se diseñaron para la secuencia no metilada. Se añadieron 5 µl de DNA tratado con bisulfito a 50 µl de mezcla de reacción de PCR que contenía 5 µl de tampón 10x TaqMan A (PE Applied Biosystemes), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 10 pmol de dNTPs, 20 pmol de cada uno de los correspondientes cebadores de MSP y 1,5 U de polimerasa de DNA AmpliTaq2 Gold (PE Applied Biosystems). Las mezclas de reacción fueron sometidas a 45 ciclos térmicos (alelo metilado: 95°C durante 45 s, 58°C durante 30 s, 72°C durante 20 s; alelo no metilado: 95°C durante 45s, 50°C durante 30 s, 72°C durante 20 s), con una etapa inicial de desnaturalización de 8 min a 95°C. Los productos de PCR se analizaron luego por electroforesis en gel de agarosa.

#### *Resultados*

65 Este experimento proporciona un ensayo de MSP para detectar secuencias de DNA metiladas y no metiladas del gen receptor andrógeno. En total se reclutaron 6 sujetos masculinos y 11 femeninos. De todos los sujetos de control masculinos, sólo se detectó en estas muestras el gen de receptor andrógeno metilado como era de esperar (Fig. 1A). A diferencia, en sujetos de control femeninos se observaron secuencias de DNA de gen receptor de andrógeno tanto no metiladas y como metiladas (Fig. 1). Los grados de detección de genes de receptor de andrógeno metilados y no

metilados fueron de 100% y 82% respectivamente. Cuando en el ensayo de MSP se omitieron muestras de DNA, no se observó señal positiva (Fig. 1A). Es interesante que se observaron señales positivas para secuencias de DNA metiladas y no metiladas en todos los receptores masculinos receptores de trasplantes de médula ósea de sexo mal emparejado (100%), lo que indica que existían células de donante femenino en la sangre en circulación de receptores masculinos.

Estos resultados demuestran por vez primera que se pueden usar genes metilados en el cromosoma X inactivado de individuos femeninos como marcador específico en investigación del quimerismo. Este ensayo también es aplicable al estudio de otros tipos de quimerismo postrasplante que implican mezcla de células masculinas y femenina o DNA. Entre los ejemplos están incluidos el quimerismo celular después de trasplante de un órgano sólido (Starzl y otros, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:292-8 (1997)), quimerismo de DNA de plasma postrasplante (Lo y otros, *Lancet* 351:1329-30 (1998)) y quimerismo urinario de DNA (Zhang y otros, *Clin Chem* 45:1741-6 (1995)). Además, recientemente hay también mucho interés en el paso de células de DNA de la madre al feto durante el embarazo (Lo y otros, *Blood* 88:4390-5, (1996); Maloney y otros, *J Clin Invest* 104:41-7 (1999); Lo y otros, *Clin Chem* 46:1301-9 (2000)). Los marcadores epigenéticos desarrollados también son de uso en el quimerismo del origen materno de vástagos masculinos.

El ensayo actual se puede desarrollar en formato cuantitativo usando, por ejemplo, tecnología de PCR a tiempo real (Lo y otros, *Cancer Res* 59:3899-903 (1999)). Tal desarrollo permitiría controlar los niveles de quimerismo en una persona particular. Clínicamente, tal ensayo puede tener un papel en el control de la aceptación de un injerto en BMT. En el caso de quimerismo de DNA urinario de plasma, tal ensayo se podría usar también para controlar el rechazo del injerto.

## Ejemplo 2

### *Metilación diferencial de DNA entre feto y madre como estrategia para detectar DNA fetal en plasma materno*

El presente experimento demuestra que usando una región metilada diferencialmente del locus humano IGF2-H19 como marcador epigenético en plasma materno, es posible la detección de un alelo que el feto ha heredado de la madre. Estos resultados extienden ampliamente las posibilidades de diagnóstico natal de DNA fetal en plasma materno, permitiendo el desarrollo de un marcador fetal específico independiente del género y el polimorfismo y nuevas estrategias para el diagnóstico prenatal de imprimir trastornos y ciertas aneuploidías cromosómicas.

### *Materiales y procedimientos*

#### *Sujetos y muestras*

Se tomaron muestras de mujeres embarazadas con consentimiento informado. En total se reclutaron para este estudio 21 mujeres en el segundo trimestre (17-21 semanas) de gestación y 18 mujeres en el tercer trimestre (37-42 semanas) de gestación. Ninguna de las mujeres reclutadas tenía preeclampsia ni manifestaciones prematuras en el embarazo en curso. De los casos del segundo trimestre de embarazo se recogieron muestras de sangre materna-EDTA y de fluido amniótico fetal como se ha descrito previamente (Lo y otros, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998)). En los casos de tercera semana de embarazo, se recogieron muestras de sangre materna EDTA 2 o 3 horas antes de suministro vaginal normal. También se recogieron inmediatamente antes del suministro muestras de sangre del cordón fetal como se ha descrito (Lo y otros, *Clin Chem* 46:1903-1906 (2000)). Se cosecharon plasma y revestimiento antelado de todas las muestras de sangre tomadas y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  como se ha descrito (Lo y otros, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998)), excepto que las muestras de plasma se recentrifugaron a 16.000 g. Las muestras de fluido amniótico se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### *Aislamiento de DNA*

Se extrajo DNA de muestras de plasma y fluido amniótico usando un kit QIAmp Blood (Qiagen). Típicamente, para la extracción de DNA se usaron 800  $\mu\text{l}$  de plasma o fluido amniótico por columna. Se usó un volumen de elución de 50-110  $\mu\text{l}$ . Se extrajo DNA del revestimiento antelado usando un kit Nucleon DNA Extraction (Scotlabs) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

#### *Tipificación del genotipo de la región polimórfica de DMR*

La DMR en el locus humano IGF2-H19 contiene dos unidades repetidas de 450 bp y siete repetidas de 400 bp (Nakagawa y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:591-596 (2001)) (Fig 2). En la investigación se selecciono como marcador un SNP A/G dentro de la DMR (Nakagawa y otros, *supra*) (Fig. 2). Se usó reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar SNP tanto en la muestra de DNA materno como en la fetal. Los cebadores se diseñaron usando la secuencia del gen H19 de *Homo sapiens* (n° de acceso a Genbank AF125183). Típicamente, se añadieron 2-5  $\mu\text{l}$  de DNA eluido, purificado de revestimiento antelado materno, revestimiento antelado del cordón o fluido amniótico a una mezcla de reacción de PCR que contenía 2,5  $\mu\text{l}$  de tampón 10x TaqMan A (PE Applied Biosystems),  $\text{MgCl}_2$  3 mM, 6,26 pmol de dNTPs, 5 pmol de cebadores (de avance: 5'-ggACGGAATTGGTTGTAGTT-3'; inverso: 5'-A-GGCAATTGTCAGTTCAGTAA-3') y 5 U de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (PE Applied Biosystems) ( $95^{\circ}\text{C}$  durante 8 min seguido de 35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 1 min,  $56^{\circ}\text{C}$  durante 20 s,  $72^{\circ}\text{C}$  durante 20 s). Para el cebador de avance, los nucleótidos de la caja superior correspondían a las posiciones 7927 a 7944 para la secuencia H19 (n°.

## ES 2 280 562 T3

de acceso del Genbank AF125183). Para el cebador inverso, los nucleótidos eran complementarios a las posiciones 8309 a 8329 de la secuencia de H19. Los productos de PCR se analizaron luego por electroforesis en gel de agarosa y secuenciación de DNA.

### 5 *Conversión con bisulfito*

La modificación con bisulfito de muestras de DNA se realizó usando un kit CpGenome DNA Modification (Intergen) según las instrucciones del fabricante. Con la conversión con bisulfito, los restos de citosina no metilados se convertirían en uracilo, mientras que los restos de citosina metilados permanecerían inalterados (Herman y otros, Proc Natl Acad Sci USA 93:9821-9826 (1996)). La diferencia de secuencia entre DNA metilado y no metilado después de la conversión con bisulfito podría distinguirse luego usando diferentes cebadores de PCR. Por lo general, en una reacción de conversión con bisulfito se usó 1  $\mu$ g de DNA de revestimiento antelado de sangre materna o de cordón, o 93  $\mu$ l de DNA purificado de plasma materno o fluido amniótico. El DNA tratado con bisulfito se eluyó luego en 25-50  $\mu$ l de Tris-EDTA 1  $\mu$ .

### 15 *PCR específica para metilación (MSP)*

Los ensayos de MSP se modificaron respecto al protocolo como se ha descrito (Herman y otros, 1996). Se añadieron 5  $\mu$ l de DNA tratado con bisulfito a una mezcla de 50  $\mu$ l de reacción de PCR que contenía 5  $\mu$ l de tampón 10x TaqMan A (PE Applied Biosystems), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 10 pmol de dNTPs, 20 pmol de cada uno de los correspondientes cebadores MSP (Fig. 2) y 1,25 U de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (PE Applied Biosystems). Los cebadores M-for y M-rev (Fig. 2) se diseñaron para la secuencia no metilada. Las mezclas de reacción se sometieron a ciclos térmicos (alelo metilado: 95°C durante 45 s, 55°C durante 20 s, 72°C durante 20 s; alelo no metilado: 95°C durante 45s, 49°C durante 20 s, 72°C durante 20 s) para 50 ciclos (DNA de revestimiento antelado y líquido amniótico) o 25 56 ciclos (DNA de plasma), con una etapa inicial de desnaturalización durante 8 min a 95°C. Los productos de PCR se analizaron luego por electroforesis en gel de agarosa. Los productos de reacción se purificaron usando columnas Microspin S-300 HR (Amersham Pharmacia) para secuenciación de DNA o ensayo de extensión de cebador.

### 30 *Secuenciación de DNA*

Se secuenciaron productos de PCR purificados usando un kit ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) y los correspondientes cebadores de los productos de PCR. Los productos de secuenciación se analizaron usando un analizador genético ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems).

### 35 *Ensayo de extensión del cebador*

Se añadieron 2  $\mu$ l del producto de MSP purificado a 25  $\mu$ l de una mezcla de reacción que contenía ddATP 50  $\mu$ M (2',3'-trifosfato de didesoxiadenuina), dGTP 50  $\mu$ M, dTTP 50  $\mu$ M, 0,2 pmol de cebador Cys-5- marcado (5'-GGGTTATTTGGGAATAGGATATTTA-3'), 4 U de Termo Sequenasa (Amersham Pharmacia) y 1,43  $\mu$ l de tampón concentrado. Las mezclas de reacción se sometieron a ciclos térmicos durante 40 ciclos (95°C durante 30 s, 51°C durante 20 s, 72°C durante 20 s). El cebador marcado Cys-5 tenía una longitud de 25 nucleótidos (nt) y el sitio polimórfico estaba 2 nt distante del extremo 3' del cebador. Para el alelo A, la incorporación del ddATP en este sitio polimórfico producirá la terminación de la cadena, lo que daría por resultado un producto de extensión de 27 nt (esto es, 25+2 nt). Para el alelo G, la continuación de la cadena seguiría hasta el siguiente resto A que estaba 5 nt distante del extremo 3' del cebador, lo que daría por resultado un producto de extensión de 30 nt (esto es, 25+5 nt). Los productos de reacción se sometieron a electroforación usando gel de poliacrilamida desnaturalizante al 14% y se analizaron usando un secuenciador ALF Express (Amersham Pharmacia). Los datos se analizaron por el programa AlleleLinks (Amersham Pharmacia).

### 50 *Resultados*

#### *Genotipificación de DMR*

Se reclutaron para este estudio 39 mujeres embarazadas. El genotipo materno en SNP dentro de la DMR (Fig. 2) se determinó por secuenciación directa de productos de PCR del DNA del revestimiento antelado. El número de mujeres embarazadas con cada uno de los posibles genotipos era de 17 (GG, 43,6%), 16 (AG, 41,0%) y 6 (AA, 15,4%).

#### *Detección de DNA fetal en plasma de heterocigotos de mujer para un polimorfismo bialélico*

Se seleccionaron para más examen las 16 mujeres que eran heterocigóticas (esto es, AG) para el SNP. Puesto que éste es un polimorfismo bialélico, estas mujeres no serían consideradas informativas en este punto para la detección de DNA fetal en plasma materno según criterios previos (Lo y otros, Ann N Y Acad Sci 731:204-213 (1994); Bianchi Am J Hum Genet 62:763-764 (1998)). Para demostrar que la metilación diferencial en esta región genómica permitiría eludir esta limitación, se trató con bisulfito DNA materno y se amplificó por MSP usando los cebadores presentados en la Fig. 2. Análogamente, DNA fetal aislado de fluido amniótico (muestras del 2º trimestre) o revestimiento antelado de sangre del cordón (muestras del 3º trimestre) se sometieron a PCR y MSP para determinar el estado de impresión de los alelos fetales.

Entre los 16 casos seleccionados, los alelos metilados (esto es, heredados del padre) de cuatro muestras fetales del 3<sup>er</sup> trimestre y siete del 2<sup>o</sup> trimestre eran diferentes de los alelos metilados de las respectivas madres (Fig. 3a, b; compárense los paneles 1 y 2). Para ensayar si esta metilación diferencial entre el feto y la madre permitiría detectar los alelos fetales del plasma materno, DNA de plasma materno de estos casos se sometió a conversión con bisulfito y seguidamente a MSP. Fue interesante que los alelos fetales metilados heredados del padre pudieron detectarse en dos muestras de plasma materno del 3<sup>er</sup> trimestre y en 4 del 2<sup>o</sup> trimestre (Fig 3a,b; paneles 3). Para excluir la posibilidad de que estas observaciones fueran debidas simplemente a existencia de DNA materno metilado aberrantemente en plasma materno, se recogió una muestra de plasma materno posnatal ( $\approx 3,5$  años después del suministro) de uno de los casos positivos para examen adicional. No se observó el alelo metilado adicional en esta muestra posnatal (Fig. 3a, panel 4), lo que indicaba que el alelo metilado adicional de la muestra materna durante el embarazo era de origen fetal. Además, no se observó señal positiva alguna en los plasmas de casos no informativos (n=4, datos no representados), lo que a su vez demostraba la especificidad de este ensayo de MSP. En conjunto, estos datos indican que el uso de la metilación diferencial entre la madre y el feto permite detectar DNA fetal en plasma materno, incluso en los casos en que no se consideran informativos de conformidad con criterios existentes.

#### *Detección de DNA heredado de la madre derivado del feto de plasma materno*

Se ensayó luego si el uso de la metilación diferencial entre madre y feto permitiría detectar un alelo que el feto hubiera heredado de la madre. Anteriormente se había creído que este tipo de análisis era imposible (Lo y otros, Ann N Y Acad Sci 731:204-213 (1994); Bianchi, Am J Hum Genet 62:763-764 (1998)). Como el alelo heredado de la madre era no metilado, se usaron los cebadores U-for y U-rev (Fig. 2) para amplificar los alelos no metilados por conversión con bisulfito. Entre los 16 casos analizados, tres muestras del 3<sup>er</sup> trimestre y cinco del 2<sup>o</sup> trimestre eran informativas. En estos casos, el feto poseía un alelo no metilado que era diferente del alelo no metilado de la madre. Los resultados implicaban que, en estos casos, la madre tenía un alelo originario de su padre que luego pasó al feto. De estos ocho casos informativos, sólo se observó una señal débil en una de las muestras del 3<sup>er</sup> trimestre en secuenciación directa (Fig. 4a, compárense paneles 1 y 2).

Los autores de la invención pensaron que esta débil señal en este único caso positivo y el bajo grado de detección del alelo fetal no metilado de plasma materno podían deberse a la baja sensibilidad del procedimiento de secuenciación directa. Para aumentar la sensibilidad de detección, se empleó un ensayo más sensible de detección de cebador con el fin de detectar el alelo no metilado fetal de los productos de reacción de MRP. Como SNP era un polimorfismo A/G, se usó ddATP como sustrato de reacción en el ensayo de extensión de cebador. Los productos de la reacción de extensión de los alelos A y G tenían una longitud de 27 y 30 nt, respectivamente. No estaba presente producto de reacción fetal específico alguno en las correspondientes muestras de revestimiento antecedido materno (Fig. 4b; BC materno). Sorprendentemente, se observaron productos de extensión específicos fetales en dos muestras de plasma materno del 3<sup>er</sup> trimestre (Fig. 4b, flecha) y una del 2<sup>o</sup> trimestre (Fig. 4c, flecha), lo que indicaba la presencia de DNA fetal no metilado en plasma materno. Como controles, ninguno de los casos no informativos ensayados fue positivo en este ensayo (n=5, datos no representados). Estos resultados demuestran, por vez primera, la viabilidad de usar marcadores epigenéticos para detectar una secuencia de DNA heredada de la madre, derivada del feto, de plasma materno.

#### *Discusión*

Estos resultados demuestran que el uso de marcadores epigenéticos elude las limitaciones convencionales para detectar DNA en plasma materno. Es posible detectar un alelo fetal heredado del padre que es indistinguible genéticamente de un alelo materno del plasma materno usando diferencias epigenéticas entre la madre y el feto. Análogamente, es posible detectar un alelo fetal del plasma materno heredado de la madre. Este nuevo enfoque epigenético extenderá, por tanto, el repertorio de trastornos en los que se puede usar DNA fetal en plasma materno.

Incluso usando procedimientos relativamente poco sensibles tales como la secuenciación directa y la extensión de cebador, los resultados presentes demuestran que se posible detectar secuencias de DNA metilado diferencialmente de plasma materno. Había una sensibilidad menor en la detección de DNA fetal no metilado en plasma materno (Fig. 4) en comparación con el ensayo análogo para el alelo metilado (Fig. 3). Usando sistemas de detección más sensibles, tal PCR específico para el alelo (Newton y otros, Nucleic Acids Res 17:2503-2516 (1989)) y PCR específica para metilación en tiempo real (Lo y otros, Cancer Res 59:3899-3903 (1999); Eads y otros, Nucleic Acids Res 28:E32 (2000)) se puede aumentar la sensibilidad para análisis epigenético basado en plasma. El desarrollo de la PCR específica para metilación en tiempo real es particularmente interesante ya que abre la posibilidad de cuantificar la metilación fetal específica en plasma materno, como se ha logrado ya para la detección de DNA en circulación de un tumor (Kawakami y otros, J Natl Cancer Inst 92:1805-1811 (2000)).

La posible introducción de DNA en plasma materno como herramienta rutinaria de diagnóstico prenatal ha suscitado cuestiones en cuanto a la necesidad de un marcador genérico para DNA fetal circulante (Lo y otros, Am J Hum Genet 62:768-775 (1998); Avent y otros, Vox Sang 78:155-162 (2000)). La mayoría de propuestas de tal marcador se ha enfocado al uso de polimorfismos genéticos entre la madre y el feto (Tang y otros, Clin Chem 45:2033-2035 (1999); Pertl y otros, Hum Genet 106:45-49 (2000)). La presente demostración de la viabilidad de marcadores epigenéticos para la detección de DNA fetal en plasma materno abre un nuevo enfoque para el desarrollo de un marcador fetal independiente del género e independiente del polimorfismo en plasma materno. Una manera de lograr esto es explotar el fenómeno de la metilación específica para el tejido (Grunau y otros, Hum Mol Genet 9:2651-2663 (2000)). Puesto que se ha sugerido que el trofoblasto es la población celular más importante para liberar DNA fetal en plasma materno,

la elucidación de las configuraciones de metilación específicas de trofoblastos permite el desarrollo de un marcador epigenético fetal genérico en plasma materno. Biológicamente, el uso de marcadores de metilación específicos para el tejido puede permitir también uno para responder directamente de la cuestión de qué tipos de células son responsables de la liberación de DNA fetal en plasma materno.

5 El análisis epigenético de plasma materno tiene aplicaciones obvias en enfermedades asociadas con la impresión genómica, tales como el síndrome de Prader-Willi (Pfeifer, Lancet 356:1819-1820 (2000)). Esta estrategia puede tener también potencial diagnóstico para trastornos tales como preeclampsia, sobre las que se ha supuesto que genes impresos desempeñan un papel (Graves, Reprod Fertil Dev 10:23-29 (1998)).

10 La posible aplicación de DNA fetal en plasma materno para la detección prenatal de aneuploidía cromosómica es una cuestión que se ha discutido vivamente desde el descubrimiento del fenómeno (Lo y otros, Lancet 350:485-487 (1997); Bianchi, Am, J Hum Genet 62:763-764 (1998)). El hallazgo de diferencias cuantitativas entre los niveles de DNA fetal circulante en embarazos aneuploides, comparados con embarazos euploides (Lo y otros, Clin Chem 15 45:1747-1751 (1999), Zhong y otros, Prenat Diagn 20:795-798 (2000)) ofrece un procedimiento para estimar el riesgo de aneuploidías cromosómicas fetales de plasma materno. El descubrimiento reciente de células apoptóticas fetales (“células derivadas de plasma”) (Van Wijk y otros, Clin Chem 46:729-731 (2000)) ofrece aún otro enfoque para la detección de aneuploidía de plasma materno (Poon y otros, Lancet 356:1819-1820 (2000)). Es interesante que los datos presentes abren otro enfoque potencial más para la detección de aneuploidías cromosómicas. Éste está basado 20 en la observación de que las configuraciones de metilación de DNA aberrantes pueden asociarse con aneuploidía cromosómica (Kuromitsu y otros, Mol Cell Biol 17:707-712 (1997), Yu y otros, Proc Natl Acad Sci USA 94:6682-6867 (1997)). A partir de esto es posible desarrollar marcadores epigenéticos para detectar tales secuencias de DNA fetal metiladas aberrantemente de plasma materno. Tales marcadores proporcionan especificidad en comparación con una simple cuantificación de DNA fetal en plasma materno (Lo y otros, Clin Chem 45:1747-1751 (1999); Zhong y 25 otros, Prenat Diagn 20:795-798 (2000)) y una adecuación mejor para aplicación a gran escala en comparación con procedimientos basados en “células derivadas de plasma” (Poon y otros, Lancet 356:1819-1820 (2000)).

30 Los marcadores epigenéticos fetales se pueden utilizar también en el análisis de aislados de células fetales de la fracción celular de sangre materna. Esto se beneficia de datos recientes que revelan que el análisis de la metilación se podría realizar de manera *in situ* (Nuovo y otros, Proc Natl Acad Sci USA 96:12754-12759 (1999)).

35 Con el conocimiento reciente de que la circulación fetomaterna es un proceso bidireccional (Lo y otros, Blood 88:4390-4395 (1996); Maloney y otros, J. Clin Invest 104:41-47 (1999)), los marcadores epigenéticos se pueden usar también para investigar la transferencia celular y de DNA de la madre al feto. Un enfoque así puede tener también aplicaciones en la investigación de otros tipos de quimerismo, tales como el quimerismo hemopoiético postrasplante (Starlz y otros, Curr Opin Nephrol Hypertens 6:292-298 (1997)) y quimerismo de DNA urinario (Zhang y otros, Clin Chem 45:1741-1746 (1999)).

40 Con la mayor comprensión del genoma humano y el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento basadas en flechas para el análisis de la metilación (Yan y otros, Clin Cancer Res 6:1432-1438 (2000)), los autores de la invención esperan que en los próximos pocos años aumentará el número de marcadores epigenéticos utilizables. Este desarrollo proporcionará un conjunto clínicamente importante de marcadores epigenéticos que se puedan usar de manera sinérgica con marcadores genéticos convencionales en plasma materno.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para diferenciar especies de DNA originarias de diferentes individuos, en el que las especies de DNA están presentes en una muestra biológica obtenida de los individuos, procedimiento que comprende la etapa de detectar una diferencia de metilación entre las especies de DNA de los diferentes individuos.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de fluido o celular, o una mezcla de ambos.
- 10 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es plasma o suero.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es sangre.
- 15 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de los individuos es una mujer embarazada y el otro individuo es un feto no nacido.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de los individuos es un receptor de un trasplante y el otro individuo es un donante de un órgano.
- 20 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el trasplante es un trasplante de médula ósea.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la etapa de medir la concentración de las especies de DNA.
- 25 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la etapa de añadir bisulfito sódico a la muestra biológica o a la especie de DNA.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la etapa de realizar una reacción en cadena de polimerasa específica para metilación.
- 30 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende las etapas de amplificar la especie de DNA para generar un producto de PCR y secuenciar el producto de PCR.
- 35 12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la etapa de realizar la extensión del cebador.
13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la muestra biológica es plasma o suero materno.
- 40 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, que además comprende la etapa de medir la concentración de DNA fetal en plasma o suero materno.
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la concentración de DNA fetal medida se usa para predecir, controlar o diagnosticar o pronosticar un trastorno.
- 45 16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la diferencia de metilación se asocia con un trastorno fetal o materno.
17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el trastorno es aneuploidía cromosómica.
- 50 18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la aneuploidía cromosómica es trisomía 21 (síndrome de Down).
19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el trastorno se selecciona entre el grupo de preeclampsia, trastorno de impresión, síndrome de Prader-Willi y síndrome de Angelman.
- 55 20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la diferencia de metilación detectada en células fetales se usa como marcador específico del feto.
- 60 21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende la etapa de medir la concentración de DNA del donante del órgano y el receptor del trasplante.
22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la concentración de DNA del donante del órgano y el receptor del trasplante se usa para predecir el progreso clínico del receptor del trasplante.
- 65 23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de los individuos es un hombre y el otro individuo es una mujer.

## ES 2 280 562 T3

24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la diferencia de metilación se detecta en un cromosoma X inactivado de la mujer.

5 25. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, en el que se usa una secuencia de DNA metilada en el cromosoma X inactivado para detectar DNA originario de la mujer.

26. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la diferencia de metilación se analiza dentro de las células.

10 27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la diferencia de metilación se analiza usando reacción en cadena de polimerasa específica para metilación *in situ*.

15 28. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la diferencia de metilación se usa para clasificar o aislar células aisladas de los individuos o se usa para purificar DNA de los individuos.

29. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la diferencia de metilación se detecta en células fetales de la placenta.

20 30. Uso de un kit para diferenciar especies de DNA originarias de diferentes individuos, en el que las especies de DNA están presentes en una muestra biológica obtenida de uno de los individuos, comprendiendo el kit uno o más reactivos para averiguar el estado de metilación de una especie de DNA.

25 31. Uso de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el reactivo para averiguar el estado de metilación es bisulfito sódico.

32. Uso de acuerdo con la reivindicación 30, que además comprende uno o más reactivos para detectar la presencia de DNA.

30 33. Uso de acuerdo con la reivindicación 30, que además comprende uno o más reactivos para amplificar el DNA presente en la muestra biológica.

34. Uso de acuerdo con la reivindicación 30, que además comprende uno o más aparatos para obtener una muestra de DNA.

35

40

45

50

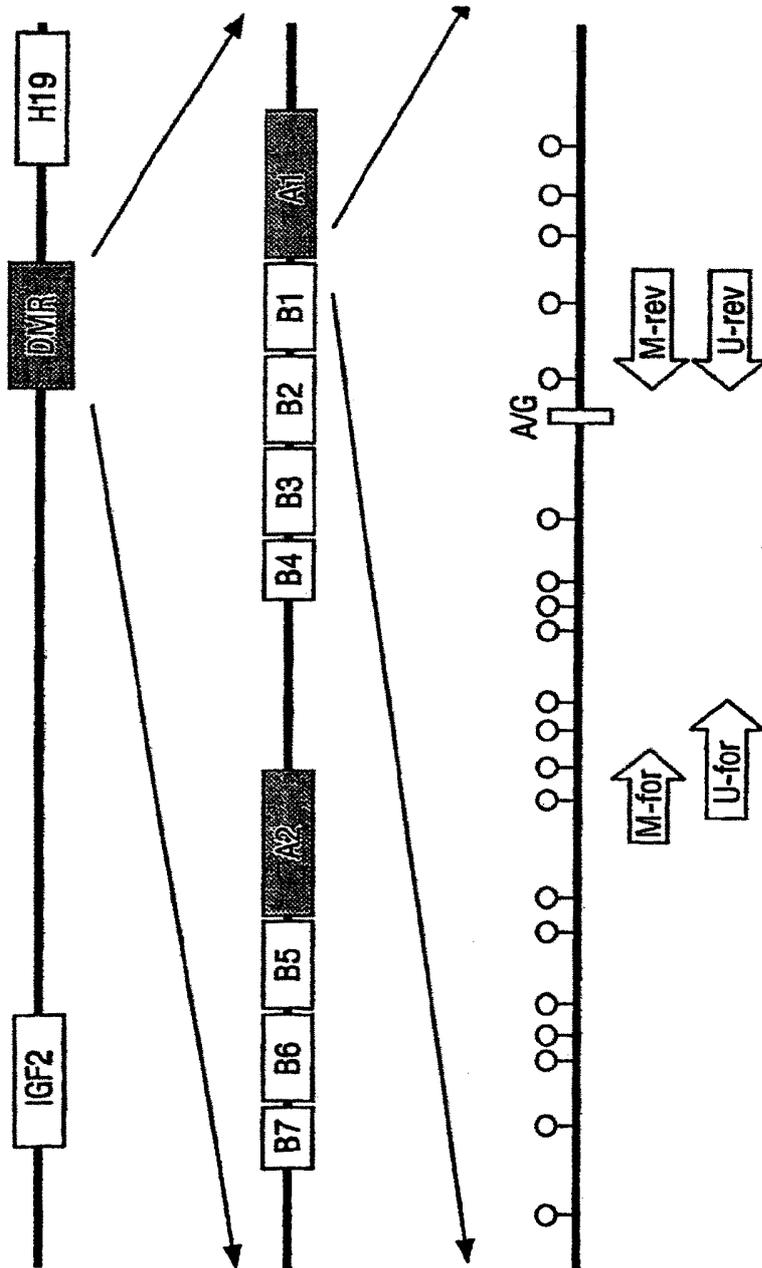
55

60

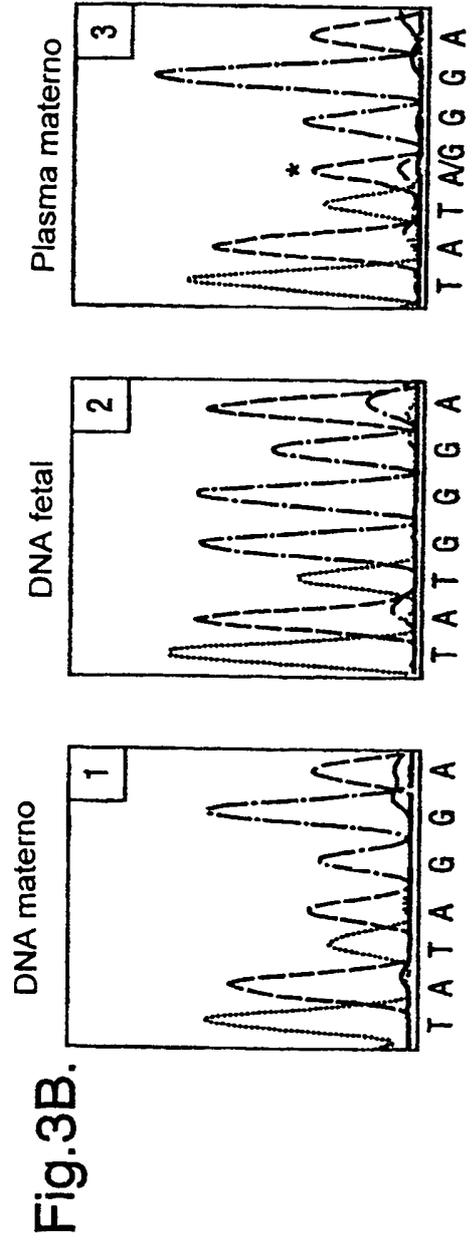
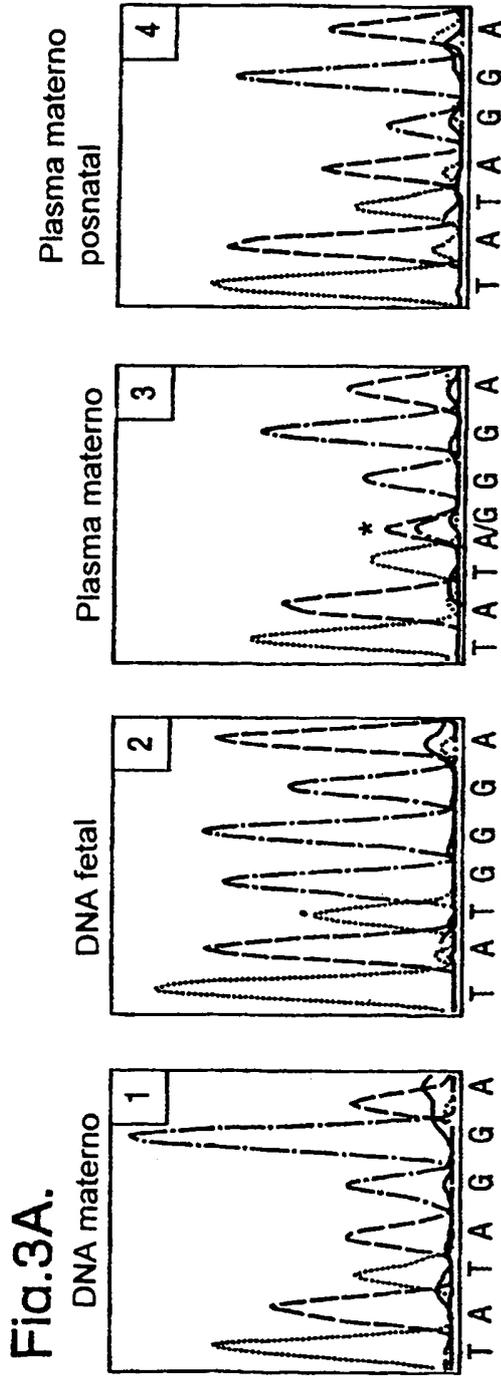
65



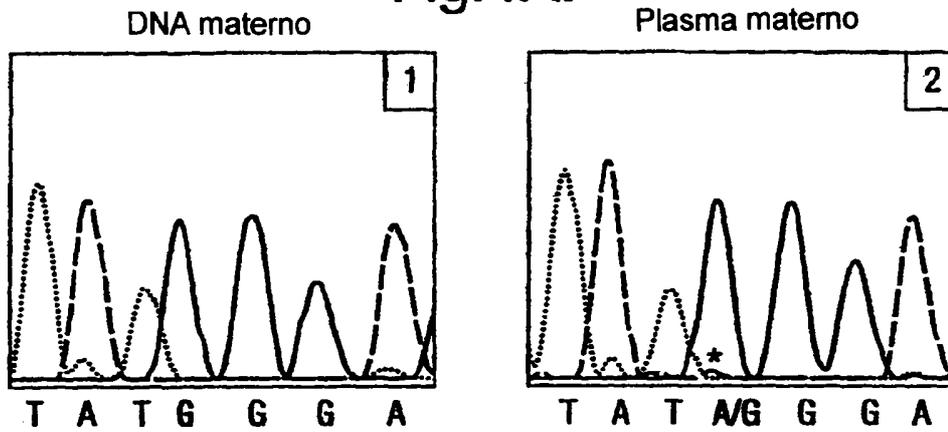
Fig.2.



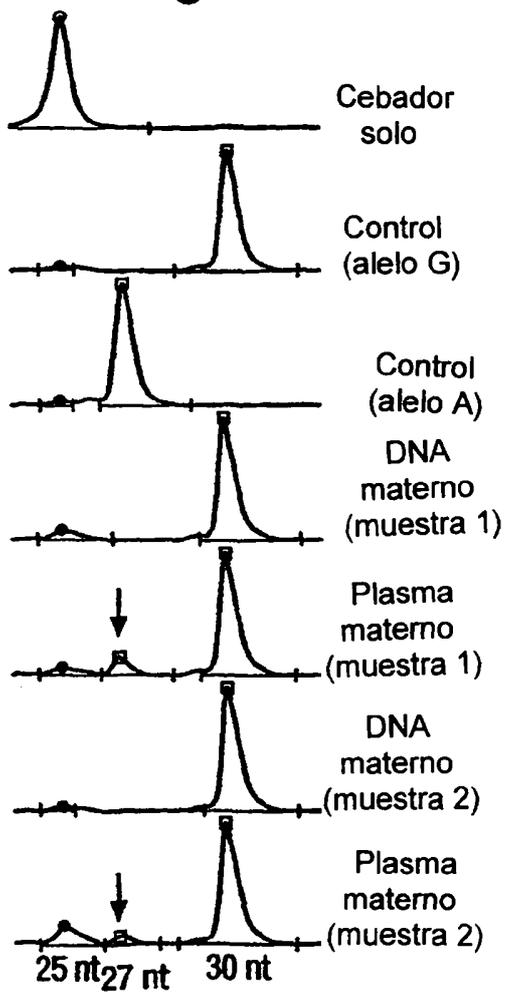
M-for: 5' -TTAATTGGGGTTCGTTGG-3'  
M-rev: 5' -CCCGACCTAAAAATCTAATACGA-3'  
U-for: 5' -CGTTTGTGTGGAAAIGTTTTI-3'  
U-rev: 5' -CCCAACCTAAAAATCTAATACAA-3'



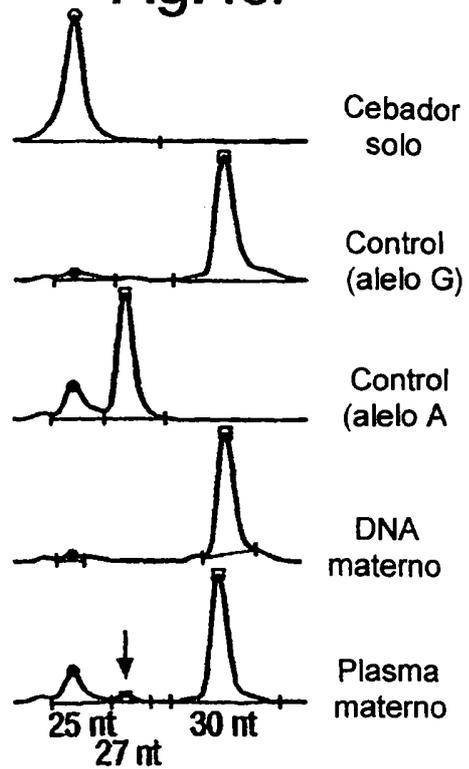
**Fig.4A.**



**Fig.4b.**



**Fig.4c.**



# ES 2 280 562 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> The Chinese University of Hong Kong  
Lo, Yuk Ming Dennis  
5 Poon, Lit Man
- <120> Procedimientos para detectar DNA originario de diferentes individuos
- <130> CMD/FP6090815
- <140> PCT/GB02/03941  
10 <141> 2002-08-30  
<150> US 09/944.951  
<151> 2001-08-31
- <160> 11  
15 <170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 21
- 20 <210> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia metilada de gen de receptor andrógeno PCR específica para metilación (MSP) cebador M-for
- <400> 1
- 30 gcgagcgtag tatttttcgg c 21
- <210> 2  
<211> 27
- 35 <210> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia metilada de gen de receptor andrógeno PCR específica para metilación (MSP) cebador M-rev
- <400> 2
- 45 aaccaataa cctataaac ctctacg 27
- <210> 3  
<211> 24  
<212> DNA
- 50 <213> Secuencia artificial  
<220>
- 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia metilada de gen de receptor andrógeno PCR específica para metilación (MSP) cebador U-for
- <400> 3
- 60 gttgtgagtg tagtatttt tggc 24
- <210> 4  
65 <211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

## ES 2 280 562 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia metilada de gen de receptor andrógeno PCR específica para metilación (MSP) cebador U-rev	
5	<400> 3	
	caaataacct ataaaacctc taca	24
10	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: polimorfismo de nucleótido singular (SNP) dentro de una región metilada diferencialmente (DMR) de la región IGF2-H19 humana PCR de amplificación cebador de	
20	avance	
	<400> 5	
25	ggacggaatt ggtgtagtt	20
	<210> 6	
	<211> 21	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: polimorfismo de nucleótido singular (SNP) dentro de la región metilada diferencialmente (DMR) de la región IGF2-H19 humana PCR de amplificación cebador inverso	
	<400> 6	
40	aggcaattgt cagttcagta a	21
	<210> 7	
	<211> 18	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: sitio de polimorfismo de nucleótido singular (SNP) dentro de la región metilada diferencialmente (DMR) de alelo metilado de la región IGF2-H19 humana PCR específico para metilación (MSP) cebador de avance M-for	
	<400> 7	
55	ttaattgggg ttcgttcg	18
	<210> 8	
60	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: sitio de polimorfismo de nucleótido singular (SNP) dentro de la región metilada diferencialmente de alelo metilado de la región IGF2-H19 humana PCR específica para metilación (MSP) cebador inverso M-rev	

## ES 2 280 562 T3

<400> 8  
cccgacctaa aaatctaata cga 23

5  
<210> 9  
<211> 22  
<212> DNA  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: sitio de polimorfismo de nucleótido singular (SNP) dentro de la región  
15 metilada diferencialmente de alelo no metilado de la región IGF2-H19 humana PCR específica para metilación  
(MSP) cebador de avance U-for

<400> 9  
20 ggtttgtttg tggaaatgtt tt 22

<210> 10  
<211> 23  
25 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: sitio de polimorfismo de nucleótido singular (SNP) dentro de la región  
30 metilada diferencialmente de alelo no metilado de la región IGF2-H19 humana PCR específica para metilación  
(MSP) cebador inverso U-rev

<400> 10  
35 cccaacctaa aaatctaata caa 23

<210> 11  
40 <211> 25  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: ensayo de extensión de cebador cebador marcado Cys-5

<400> 11  
50 gggttatttg ggaataggat attta 25

55

60

65