

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 964**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

C12Q 1/6858 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/GB2014/050810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14140630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14713570 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 2971082**

54 Título: **Detección prenatal no invasiva**

30 Prioridad:

15.03.2013 GB 201304810

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

29.03.2021

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)
Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**SCHUH, ANNA y
HENDERSON, SHIRLEY JANE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 814 964 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

Detección prenatal no invasiva

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para la detección de trastornos genéticos y, en particular, la detección prenatal no invasiva.

10 Antecedentes de la invención

El diagnóstico prenatal ofrece a las parejas la posibilidad de identificar trastornos genéticos. Existen diversos procedimientos para realizar dicha detección, algunos invasivos, otros no invasivos, aunque, en la actualidad, los procedimientos no invasivos son limitados. Un abordaje no invasivo es utilizar ADN fetal libre de células circulante (ADNfccc) en el plasma materno, que se origina a partir de células trofoblásticas y constituye el 5-15 % del ADN plasmático total. Sin embargo, los trastornos para los que se utiliza el ADNfccc para el diagnóstico se limitan a aquellos con características particulares que facilitan el diagnóstico.

Por ejemplo, el uso de ADNfccc para fines tales como la determinación del sexo fetal y la tipificación Rhesus se basa en la identificación de alelos que el feto ha heredado por vía paterna y, por lo tanto, no están presentes en la madre, lo que simplifica la detección de dichos trastornos. El desarrollo de nuevos abordajes que permitan la detección de otros trastornos mediante ADNfccc es importante, entre los trastornos en los que existe la necesidad de proporcionar un mejor diagnóstico prenatal se encuentran los trastornos recesivos, particularmente aquellos en los que las mutaciones subyacentes son alteraciones pequeñas, en lugar de reordenamientos cromosómicos o trisomías a gran escala. Por ejemplo, en algunos casos, tanto el padre como la madre serán portadores de la misma mutación puntual recesiva, lo que hace que la detección prenatal sea particularmente difícil.

La detección prenatal se realiza con mayor frecuencia para trastornos particularmente graves, entre dichos trastornos se encuentra la anemia de células falciformes. La anemia de células falciformes es el trastorno de un solo gen más común en el mundo. Sigue siendo más frecuente en África y Oriente Medio, pero las recientes inmigraciones significan que ahora es un problema de salud importante en la población del Reino Unido, con una incidencia de nacimientos de 1:2.400. En 2004, el Reino Unido inició un programa universal de detección prenatal con el propósito de identificar y ayudar a las parejas en riesgo de tener un hijo afectado por anemia de células falciformes. Actualmente, a las parejas que optan por un diagnóstico prenatal se les ofrecen pruebas fetales mediante procedimientos invasivos, tales como amniocentesis y muestreo de vellosidades coriónicas.

La anemia de células falciformes es ahora la indicación más común para este tipo de diagnóstico prenatal en el Reino Unido, con aproximadamente 420 procedimientos realizados anualmente. Sin embargo, estos procedimientos conllevan un riesgo para el feto que es inaceptable para algunas parejas, por lo que el desarrollo de procedimientos no invasivos es importante.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de detección prenatal para un trastorno recesivo y/o un trastorno causado por una mutación puntual, que comprende:

- (a) amplificar una región que abarca el sitio de una mutación responsable del trastorno, realizándose la amplificación en una muestra de ADN obtenida de una gestante que comprende ADN materno y fetal; y
- (b) secuenciar una pluralidad de productos de la amplificación y determinar si el alelo mutante está representado o no con una frecuencia diferente de la esperada del genotipo de la gestante únicamente, en el que la amplificación se realiza mediante una PCR de dos etapas, donde la primera etapa amplifica el amplicón de interés y la segunda etapa introduce secuencias adicionales que no están presentes en el molde.

Los inventores también describen un cebador que es:

- (a) un cebador que consiste en la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4;
- (b) seleccionado del grupo que consiste en un cebador que comprende la secuencia de las SEQ ID No: 10 a 15, un cebador que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 10 a 15 y un cebador con al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de los cebadores anteriores; o
- (c) seleccionado del grupo que consiste en; (i) un cebador que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID No: 11, 13 o 15, pero el que una secuencia índice se inserta entre los nucleótidos 24 y 25 de la secuencia de las SEQ ID No: 11, 13 o 15; (ii) un cebador que comprende una secuencia del cebador de (i); o (iii) un cebador con al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de los cebadores anteriores.

Los inventores también describen un conjunto de cebadores que comprende:

- (a) al menos tres pares de cebadores, donde cada par de cebadores amplifica una región que abarca una mutación responsable de un trastorno; y
 (b) al menos tres pares de cebadores más, donde cada uno de los pares de cebadores puede amplificar uno de los amplicones generados por los pares de cebadores de (a) pero también añadir secuencias adicionales que no están presentes en el molde.

Los inventores también describen un conjunto de cebadores que comprenden al menos cuatro cebadores de la invención, donde los cebadores son capaces de amplificar tres amplicones del gen de la beta globina que abarca el sitio de mutación de HbS.

Los inventores también describen un kit que comprende:

- (a) un conjunto de cebadores de la invención; y
 (b) instrucciones para realizar el procedimiento de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: El panel (A) muestra la ubicación de los pares de cebadores empleados en los ejemplos en relación con el exón 1 del gen HBB. El panel (B) muestra los tres amplicones que resultan de la amplificación.

Figura 2: El panel (A) ilustra una PCR de dos etapas, se realiza una preamplificación inicial, seguido de una segunda amplificación para introducir secuencias adicionales en los productos de PCR para ayudar a la secuenciación y el análisis. El panel (B) muestra un ejemplo de un cebador para su uso en la segunda PCR y las secuencias que no son del molde que introduce en el producto de amplificación.

Figura 3: El panel (A) muestra la secuencia de los tres amplicones. El panel (B) muestra los ocho alelos diferentes que resultan de la variación en tres sitios, incluido el sitio de la mutación de la anemia de células falciformes.

Figura 4: Proporciona una ilustración de una realización preferida de la invención en términos de preparación y análisis de muestras.

Figura 5: El panel (A) proporciona una ilustración más detallada de un par de cebadores usado en la segunda PCR en los Ejemplos. El panel (B) proporciona un resumen de una posible realización para el análisis de datos.

Figura 6: Proporciona un resumen ilustrativo adicional de cómo se obtuvieron los datos obtenidos en el procedimiento de ejemplo para la anemia de células falciformes.

Descripción detallada

La presente invención proporciona procedimientos para el diagnóstico prenatal y en particular para el diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI). Los procedimientos se utilizan para la detección de trastornos recesivos y/o mutaciones puntuales.

En un caso particularmente preferido, el procedimiento comprende medir la proporción alélica de tipo salvaje a mutante, por lo general, evaluando muestras que contienen ADN tanto fetal como materno y buscando divergencias de la proporción que se esperaría del ADN materno únicamente. Por ejemplo, un feto afectado se puede distinguir de un feto que es un portador heterocigoto midiendo la desviación de una relación alélica 1:1 que se produce por la representación excesiva del alelo mutante donde el feto tiene el trastorno.

Trastornos y mutaciones

La divulgación se puede emplear para detectar cualquier trastorno o enfermedad genética adecuada. En un caso preferido, el trastorno que se debe detectar es un trastorno recesivo. En un caso preferido, el trastorno que busca puede ser una enfermedad de células falciformes y, en un caso especialmente preferido, el trastorno puede ser anemia de células falciformes.

En un caso, la invención se empleará cuando se sepa que ambos padres son portadores del mismo trastorno recesivo, particularmente cuando ambos padres portan la misma mutación para el trastorno. Es posible que los padres ya hayan tenido un hijo afectado por el trastorno. Por ejemplo, uno o ambos padres pueden provenir de una familia cuyo pedigrí se sabe que incluye uno o más parientes con el trastorno. Los padres pueden provenir de un grupo que se sabe que tiene una alta incidencia de la afección, por ejemplo, en el caso de la anemia de células falciformes, los padres pueden ser de origen africano y, en el caso del síndrome de Tay-Sachs, los padres pueden ser de origen judío Ashkenazi.

La divulgación es particularmente aplicable cuando la afección que se está examinando es grave. Un trastorno preferido para el que se puede utilizar la invención para detectar es una talasemia. En un caso especialmente preferido, el trastorno es la anemia de células falciformes. En un caso adicional, el trastorno es fibrosis quística. En otro caso

preferido, el trastorno es síndrome de Tay-Sachs. En otro caso, el trastorno es la enfermedad del riñón poliquístico autosómica recesiva (ERPAR). En un caso adicional, el trastorno es atrofia muscular espinal (AME). En un caso adicional, el trastorno es distrofia muscular. En un caso, el trastorno es un trastorno hematológico y puede ser, por ejemplo, una hemostasia. En un caso, el trastorno es una hemofilia. Entre los ejemplos de hemofilia que pueden detectarse se incluyen hemofilia A y hemofilia B.

Otros trastornos que pueden detectarse incluyen trastornos del metabolismo de los lípidos, deficiencias de la oxidación de ácidos grasos peroxisomales y mitocondriales, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de los aminoácidos y compuestos relacionados, trastornos del metabolismo de los carbohidratos, hiperplasia suprarrenal congénita, enfermedades de inmunodeficiencia primaria y trastornos del tejido óseo y conjuntivo (incluyendo, por ejemplo, osteogénesis imperfecta).

La divulgación se puede aplicar a cualquier mutación adecuada. En un caso preferido, la mutación examinada es una mutación puntual, particularmente una mutación puntual que es responsable de una afección recesiva. En un caso, por tanto, la mutación puede ser una sustitución de bases, por ejemplo, la mutación puede ser una mutación de una sola base, preferentemente, una sustitución de una sola base. En otro caso, la mutación puede ser una delección, por ejemplo, una delección de menos de 100 pb, menos de 75 pb, menos de 50 pb, menos de 40 pb, menos de 30 pb, menos de 20 pb, menos de 10, 9, 8, 7 o 6 bases de tamaño. La delección puede ser, en algunos casos, de 5, 4, 3, 2 o 1 bases de tamaño y, en un caso preferido, es una delección de una sola base. La mutación también puede ser una inversión, por ejemplo, de cualquiera de los tamaños especificados. La mutación puede ser una duplicación, por ejemplo, una duplicación de cualquiera de dichas longitudes. La mutación puede, por ejemplo, en algunos casos (a) provocar un cambio de aminoácidos, (b) dar como resultado un codón de terminación que causa una traducción prematura o (c) dar como resultado un cambio en el corte y empalme en el ARN.

En un caso preferido, la mutación puede ser la responsable de la enfermedad. En otros casos, la mutación o polimorfismo puede estar estrechamente relacionado con la mutación de la enfermedad, por ejemplo, en desequilibrio de ligamiento con la mutación de la enfermedad. En un caso, el marcador genético que se utiliza es un SNP asociado con el trastorno. Puede emplearse cualquier SNP adecuado que se sepa que está asociado con la enfermedad que se analiza. Por lo tanto, en algunos casos, el cambio de secuencia que se está buscando es un polimorfismo que no es en sí mismo responsable del trastorno.

En un caso preferido, la afección que se está buscando es una en la que una mutación particular asociada o que causa la enfermedad se encuentra en una proporción significativa de pacientes, por ejemplo, se encuentra una mutación particular en al menos el 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 % o más de los enfermos. Puede ser que ambos padres hayan sido identificados como portadores de esa mutación específica. Parte del procedimiento de la divulgación puede comprender identificar la mutación portada por los padres o el procedimiento puede realizarse en individuos en los que ya se ha identificado la mutación que portan.

En un caso particularmente preferido, la mutación es la mutación de anemia de células falciformes más común y también lo es un solo cambio de A a T en el sexto codón del gen de la beta-globina que da como resultado la sustitución de un aminoácido glutámico por valina. Por lo tanto, en dichos casos, el procedimiento se puede utilizar para detectar la anemia de células falciformes y determinar si el feto es homocigoto para esa mutación.

Otro ejemplo de una mutación particularmente preferida que se puede detectar es la mutación Hb C, que es un cambio de secuencia de G a A en el sexto codón del gen de la beta-globina que da como resultado que un aminoácido glutámico sea sustituido por lisina.

En un caso, el procedimiento puede usarse para detectar tanto la mutación de la anemia de células falciformes como la mutación de la Hb C.

Muestras de ADN

Los procedimientos de la invención se realizan típicamente en una muestra materna, que es una muestra obtenida de una sujeto embarazada. Por lo tanto, en un caso especialmente preferido, el procedimiento se realiza en una muestra de una mujer embarazada, por lo que la muestra es humana, aunque el procedimiento también se puede realizar en un animal no humano preñado. El procedimiento se realiza, preferentemente, en ADN recogido usando un abordaje no invasivo.

En un caso, la muestra tomada es una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de heces o una muestra de saliva. Los ejemplos preferidos de muestras incluyen, muestras de sangre, de orina y de saliva. En un procedimiento especialmente preferido, la muestra es una muestra de sangre. La referencia a una muestra de sangre incluye una muestra de sangre entera, una muestra de plasma o una muestra de suero y se puede usar cualquiera de ellas.

En un caso, puede emplearse cualquier muestra no invasiva que comprenda moléculas de ADN representativas del genoma del feto en desarrollo así como del de la madre. Por ejemplo, el procedimiento puede realizarse preferentemente utilizando una muestra de sangre materna y, en particular, ADN extraído de la sangre materna,

preferentemente que comprende ADNficc. En un caso preferido, la muestra se obtiene por enriquecimiento y cuantificación de secuencias de ADN libres de células seleccionadas en una muestra de sangre materna. En un caso especialmente preferido, la muestra es, o comprende, ADNficc, particularmente la extraída de una muestra de sangre tomada de la gestante.

El procedimiento también se puede realizar en una muestra de control, por ejemplo, una muestra de control de una mujer embarazada en la que se sabe que el feto es homocigoto para el trastorno que se está buscando, un portador o tener un genotipo de tipo silvestre. También se pueden emplear muestras de control producidas mezclando una cantidad conocida de ADN de un genotipo particular con ADN de un portador. Por ejemplo, utilizando la anemia de células falciformes como ejemplo, un control puede comprender ADN de un portador de células falciformes mezclado con una pequeña cantidad de ADN de (a) un individuo con anemia de células falciformes; (b) un individuo portador de anemia de células falciformes; o (c) un individuo de tipo silvestre. Por ejemplo, un 5 % o menos del ADN de (a), (b) o (c) puede estar presente en un caso. Al usar dichas muestras, es posible imitar la mezcla de ADN materno y fetal que se encontrará en las muestras de prueba y así proporcionar un control. Dicho abordaje puede emplearse para cualquier trastorno que se esté explorando. Dichos controles pueden estar presentes en los kits de la divulgación.

Preparación de la muestra

Para ayudar a optimizar los resultados, la preparación de la muestra se puede realizar, preferentemente, de una manera particular, particularmente cuando la muestra comprende, o es, ADNficc, ya que el ADNficc puede estar sujeto a degradación.

En un caso, las muestras se tratan rápidamente para ayudar a evitar la degradación del ADN y, en particular, la degradación del ADNficc. Por lo tanto, en un caso preferido, la muestra se procesa y está lista para el análisis dentro de las 24 horas posteriores a su obtención, por ejemplo, en 20 horas, 18 horas, 16 horas, 12 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora. En un caso particularmente preferido, la muestra se procesa en un plazo de aproximadamente 7 horas y, en particular, en un plazo de aproximadamente 6 horas. Puede ser que la muestra no se analice inmediatamente, pero se almacena en condiciones que evitan o minimizan una mayor degradación de la muestra, por ejemplo, congelando la muestra, tal como a -80° C.

En una realización preferida, la sangre será la muestra obtenida del paciente y, en un caso especialmente preferido, la muestra de sangre se centrifugará y el plasma se separará de la fracción celular dentro de cualquiera de los períodos de tiempo especificados anteriormente, particularmente en un plazo de aproximadamente 8 horas, preferentemente en un plazo de aproximadamente 7 horas y, más preferentemente, en un plazo de aproximadamente 6 horas. Por ejemplo, la sangre puede centrifugarse, separando a continuación el plasma y congelándolo, en un caso preferido, la muestra de sangre se centrifuga, el plasma se separa, el plasma se vuelve a centrifugar y, después, el plasma se separa de nuevo, preferentemente, la muestra se congela después. Dicho abordaje se puede emplear opcionalmente en cualquiera de las realizaciones tratadas en el presente documento y, preferentemente, es así.

Alternativa o adicionalmente, las muestras se pueden recoger de una manera que ayude a prevenir o reducir la degradación del ácido nucleico y, en particular, la degradación de los ácidos nucleicos libres de células. Por ejemplo, las muestras de sangre se pueden recoger en receptáculos que ayuden a prevenir la degradación del ácido nucleico y, en particular, la degradación de los ácidos nucleicos libres de células en las muestras. Dichos recipientes pueden comprender un conservante que inhiba la degradación del ácido nucleico, un inhibidor del metabolismo y/o un inhibidor de una enzima responsable de la degradación del ácido nucleico. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen los de Streck que inhiben la degradación del ácido nucleico del ADN libre de células.

En un caso preferido, la muestra, particularmente una muestra de sangre, se procesa en uno de los períodos de tiempo especificados anteriormente y utilizando un receptáculo que inhibe o reduce la degradación del ácido nucleico, particularmente la degradación de ácidos nucleicos libres de células.

Una vez que se ha preparado y procesado una muestra, preferentemente se extrae después el ADN. En un caso preferido, cuando se ha congelado una muestra, el ADN se extrae inmediatamente después de descongelar la muestra. Puede emplearse cualquier técnica de extracción de ADN adecuada para obtener el ADN para el análisis. En un caso preferido, el ADN se extrae utilizando un kit de ácido nucleico circulante QIAmp.

En un caso particularmente preferido, la muestra de ADN se analiza para confirmar la presencia de ADN fetal. Ese puede ser particularmente el caso cuando se utiliza una muestra que comprende ADNficc, debido a la posibilidad de degradación de la muestra, particularmente si no se centrifuga lo suficientemente rápido. El análisis de la presencia de un marcador fetal para confirmar la presencia de ADN fetal se puede realizar por separado o como parte del procedimiento de la invención. Se puede analizar cualquier marcador adecuado para confirmar la presencia de ADN fetal en la muestra, con un caso de un posible marcador que es el marcador RASSF1A.

En un caso preferido, el marcador empleado para detectar el ADN fetal es cualquier polimorfismo de nucleótido único (SNP) adecuado que el feto haya heredado del padre y que no esté presente en la madre. En el caso de un feto masculino, se puede utilizar el cromosoma Y, ya que el ADN materno carecerá de secuencias del cromosoma Y, de

modo que la presencia de cualquier secuencia del cromosoma Y se puede utilizar para confirmar la presencia de ADN fetal y/o cuantificar la cantidad de ADN fetal. En otros casos, pueden usarse repeticiones cortas polimórficas en tándem, SNP y/o marcadores indel, tal como un panel de cualquiera de esos marcadores.

En un caso preferido adicional, se puede cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra. El procedimiento puede cuantificar la cantidad de ADN fetal presente. Por ejemplo, la cantidad de ADN presente puede cuantificarse mediante PCR, por ejemplo, mediante PCR en tiempo real o cualquier otra técnica adecuada, y dicho abordaje puede usarse para cuantificar la cantidad de ADN fetal usando cualquiera de los marcadores de ADN fetal tratados en el presente documento. En un caso, el procedimiento empleado para cuantificar la cantidad de ADN fetal puede ser el descrito en White et al (2012), Evaluation of a Novel Assay for Detection of the Fetal Marker RASSF1A: Facilitating Improved Diagnostic Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. PLoS ONE 7(9): e45073. doi:10.1371/journal.pone.0045073.

Por lo tanto, cualquiera de los procedimientos de la invención puede comprender, opcionalmente, la cuantificación de la cantidad de ADN fetal presente.

En general, por lo tanto, las realizaciones preferidas de la invención pueden incluir en algunos casos: (a) la muestra que comprende ADNficc; b) la muestra procesada en un plazo de ocho horas, particularmente aproximadamente siete horas y, más particularmente, en un plazo de aproximadamente seis horas; y/o (c) se confirma la presencia de ADN fetal y, en particular, se cuantifica la cantidad. En algunos casos, por ejemplo, se aplicarán tanto (a) como (b), en otros, se emplearán preferentemente todos los de (a) a (c).

En realizaciones preferidas adicionales, la invención puede incluir en algunos casos: (a) la muestra que comprende ADNficc; (b) la muestra que se está tratando para evitar la degradación del ADN, por ejemplo, utilizando recipientes de recogida que inhiben dicha degradación; y/o (c) se confirma la presencia de ADN fetal y, en particular, se cuantifica la cantidad. En algunos casos, por ejemplo, se aplicarán tanto (a) como (b), en otros, se emplearán preferentemente todos los de (a) a (c).

En realizaciones preferidas adicionales de la invención, en algunos casos se pueden incluir: (a) la muestra que comprende ADNficc; b) la muestra procesada en un plazo de ocho horas, particularmente aproximadamente siete horas y, más particularmente, en un plazo de aproximadamente seis horas y/o la muestra que se está tratando para prevenir la degradación del ADN, por ejemplo, utilizando recipientes de recogida que inhiben dicha degradación; y/o (c) se confirma la presencia de ADN fetal y, en particular, se cuantifica la cantidad. En algunos casos, por ejemplo, se aplicarán tanto (a) como (b), en otros, se emplearán preferentemente todos los de (a) a (c).

Cebadores y amplicones

En la invención se puede emplear cualquier par de cebadores adecuado. En un caso, se elige un amplicón para amplificar y los pares de cebadores se diseñan en consecuencia. En un caso particularmente preferido, la amplificación dará como resultado una población de productos de amplificación que es representativa del ADN molde de partida, en particular, en referencia a la incidencia de moléculas molde maternas y fetales dentro de la muestra original.

Normalmente, el amplicón comprenderá el sitio de la mutación o las mutaciones que se están evaluando. Mediante la secuenciación del producto de PCR, normalmente es posible determinar la representación de alelos particulares para la región en el producto de PCR y, por tanto, en la muestra original. Al determinar la divergencia de lo que se esperaría para el genotipo materno, por lo general, es posible identificar la contribución del ADN fetal en la muestra y, por lo tanto, normalmente si el feto tiene el trastorno que se busca. En un caso preferido, se puede determinar el genotipo del feto para el trastorno.

Por ejemplo, tomando el caso de la anemia de células falciformes como ejemplo ilustrativo:

- ambos padres serán portadores del alelo de las células falciformes, por lo que el ADN materno por sí solo, sin ADN fetal, debe tener una proporción de 1:1 para los alelos de tipo silvestre y mutantes;
- si el feto también es portador de anemia de células falciformes, entonces, la presencia de ADN fetal no alterará la proporción de alelos de tipo silvestre y mutantes en la muestra, porque el feto tiene el mismo genotipo que la madre;
- si el feto tiene anemia de células falciformes, el feto es homocigoto para el alelo mutante y la presencia de ADN fetal en la muestra materna significará que el alelo mutante debe estar sobrerrepresentado en comparación con lo que se esperaría del ADN materno por sí solo; y
- por el contrario, si el feto es de tipo silvestre, la presencia de ADN fetal significará que el alelo de tipo silvestre estará sobrerrepresentado en comparación con lo que se esperaría del ADN materno únicamente.

En un caso preferido, se amplificará más de un amplicón. Por ejemplo, puede haber una pluralidad de amplicones y, en particular, amplicones superpuestos donde cada amplicón comprende los sitios de mutación. Adoptando dicha estrategia, los diferentes amplicones pueden usarse para confirmar aún más el resultado dado por los otros amplicones. En un caso, se pueden amplificar dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete amplicones o al menos dichas cifras.

En un caso preferido, se pueden amplificar tres, cuatro o cinco amplicones y, en particular, tres amplicones.

En un caso, un solo amplicón se amplifica utilizando un par de cebadores, pero más de una vez. Por lo tanto, el mismo amplicón puede amplificarse en paralelo en reacciones separadas. Por ejemplo, el mismo amplicón puede amplificarse por duplicado, por triplicado, cuatro veces o más. Puede ser que dichas amplificaciones paralelas se realicen como una forma de confirmar aún más los resultados observados. En un caso preferido, el mismo amplicón se amplifica por triplicado en reacciones separadas.

En otro caso, se puede elegir más de un amplicón con diferentes amplicones que abarcan diferentes sitios de mutación. Puede ser que se elijan múltiples amplicones para permitir la detección de más de una mutación y/o de más de un trastorno, preferentemente al mismo tiempo. En dichos casos, puede ser que para cada mutación y/o trastorno haya amplicones superpuestos como se ha descrito anteriormente.

En un caso preferido, puede ser que el amplicón tenga menos de 500 pb de longitud, por ejemplo, inferior a 400 pb, 300 pb, 250 pb, 200 pb o 150 pb de longitud, en algunos casos menos de 140 pb, 130 pb, 125 pb o 120 pb de longitud. Puede ser que el amplicón tenga menos de 110 pb, 100 pb o 90 pb de longitud. En algunos casos, todos los amplicones estarán por debajo de dicha longitud.

En un caso particularmente preferido, se puede emplear más de un par de cebadores para cada amplicón. Por ejemplo, se puede usar un primer par de cebadores para realizar una amplificación inicial del amplicón, después, se puede emplear un segundo par de cebadores para amplificar más el amplicón. Dicho abordaje de dos etapas puede ayudar a garantizar que la frecuencia alélica sea lo más cercana posible en el producto final de la PCR a la del molde original. Puede ser que el segundo par de cebadores empleado en la segunda amplificación introduzca secuencias adicionales a las amplificadas a partir del molde. Por ejemplo, el segundo conjunto de cebadores puede introducir secuencias adicionales para ayudar a facilitar el análisis de los datos de secuencia obtenidos.

En un caso, al menos uno de los cebadores incluye una secuencia única para cada amplicón para permitir distinguir los productos de cada amplicón. En un caso, los cebadores para la segunda PCR tienen adaptadores específicos para la generación de clúster. En otro caso, los cebadores para la segunda amplificación tienen un sitio de unión para un cebador de secuenciación. En un caso adicional, al menos uno de los cebadores comprende las secuencias para la generación de clúster, así como la secuencia para el cebador de secuenciación, en algunos casos, todos los cebadores lo hacen. En un caso particularmente preferido, al menos uno, y preferentemente todos, de los cebadores para la segunda amplificación tienen adaptadores específicos de Illumina.

En una realización preferida adicional, al menos uno de los cebadores de cada par comprende un "código de barras" o secuencia índice que permite la identificación de un amplicón específico. Al proporcionar el mismo par de cebadores, pero con diferentes secuencias de "códigos de barras" presentes, también es posible asignar un código de barras particular a un paciente en particular y luego analizar las muestras de los diferentes pacientes simultáneamente, porque los resultados de cada paciente se indican mediante un código de barras particular. También es posible tener un código de barras donde una parte de la secuencia sea exclusiva del amplicón, indicando el otro indica de qué paciente proviene el código de barras. Dicho abordaje puede permitir la combinación de muestras para secuenciar.

En un caso, en el que la invención se emplea para detectar anemia de células falciformes, al menos uno y preferentemente todos los amplicones están ubicados en el exón 1 del gen de la beta-globina. En un caso preferido, se pueden emplear uno o más de los siguientes cebadores en la invención para su uso en el cribado de la anemia de células falciformes:

- 872_HBS_F4 (SEQ ID No: 1) - "ACTAGCAACCTCAAACAGACACCATG";
- 875_HBS_R2 (SEQ ID No: 2) - "GTTTACCTTGCCCCACAGGGCAGTA"
- 879_digSickleF (SEQ ID No: 3) - "GCAACCTCAAACAGACACCAT"
- 880_disgSickleR (SEQ ID No:4) - "CCCCACAGGGCAGTAACG".

Puede ser que se emplee un cebador que comprenda una de las secuencias anteriores, o, en otros casos, se puede emplear un cebador que consiste en la secuencia anterior. En otros casos, se puede usar un cebador con al menos un 90 % 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con uno de los cebadores anteriores. En algunos casos, se puede usar un cebador con no más de cinco, cuatro, tres, dos o un cambios de secuencia de bases en comparación con uno de los cebadores anteriores.

En un caso preferido, se pueden emplear uno o más de los siguientes pares de cebadores:

- Set 1: 872_HBS_F4 (SEQ ID No: 1) + 875_HBS_R2 (SEQ ID No: 2)
- Set 2: 879_digSickleF (SEQ ID No: 3) + 875_HBS_R2 (SEQ ID No:2)
- Set 3: 879_digSickleF (SEQ ID No: 3) + 880_disgSickleR (SEQ ID No: 4)

En un caso particularmente preferido, en la invención se emplean los cuatro cebadores para los tres pares de cebadores anteriores.

Se pueden usar otros pares de cebadores correspondientes a los pares anteriores, pero con cualquiera de los niveles de identidad de secuencia o cambios de secuencia. Por ejemplo, en lugar de un cebador de secuencia de la SEQ ID No:1, se puede emplear un cebador que comprenda dicha secuencia en el par de cebadores, o un cebador con uno de los niveles de identidad de secuencia especificados anteriormente o un cebador con uno de los niveles anteriores de cambios de secuencia y que también se aplica a los otros cebadores.

Los inventores también describen un conjunto de cebadores que comprenden al menos uno de los pares de los cebadores anteriores, preferentemente al menos tres de los cebadores anteriores y, más preferentemente, los cuatro cebadores. Por lo tanto, en un caso preferido, los inventores describen un conjunto de cebadores que consisten en los cebadores mencionados anteriormente.

Los inventores también describen un kit que comprende:

- (a) un conjunto de cebadores de la invención; y
- (b) instrucciones para realizar el procedimiento de la invención.

En un caso preferido, los cebadores mencionados anteriormente se utilizan en la amplificación inicial

En un caso preferido adicional, la segunda amplificación se realiza usando cebadores basados en los cebadores usados en la primera amplificación, pero con las secuencias adicionales para ayudar a identificar los amplicones y/o el análisis de los datos recopilados. En un caso, al menos uno de los cebadores en cada par de cebadores incluirá una "secuencia índice" para permitir la identificación del amplicón de ese emparejamiento. Puede emplearse cualquier secuencia índice adecuada, por ejemplo, los ejemplos ilustrativos de posibles secuencias índice incluyen:

Índice6: ATTGGC (SEQ ID No: 5) Índice12: TACAAG (SEQ ID No: 6)
 Índice4: TGGTCA (SEQ ID No: 7) Índice5: CACTGT (SEQ ID No: 8)
 Índice7: GATCTG (SEQ ID No: 9)

En un caso, los índices anteriores se utilizan en el orden indicado, es decir, índice 6, índice 12, índice 4, índice 5 e índice 7.

A continuación se presentan ejemplos de cebadores directos e inversos que pueden emplearse en la segunda PCR:

Secuencia del cebador para la segunda amplificación:

Amplicón 1:

F4_seq

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
 ATCTACTAGCAACCTCAAACAGACACCATG (SEQ ID No: 10)

R2_seq

Un cebador que comprende la SEQ ID No: 16 unida por una secuencia índice a la SEQ ID No: 17, teniendo las SEQ ID No: 16 y 17 las siguientes secuencias:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[SEQ ID NO:16]

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTACCTTGCCCCACAGGGGCA
 GTA [SEQ ID NO:17].

Por tanto, el cebador tiene la fórmula SEQ ID NO: 16-ÍNDICE-SEQ ID NO:17, donde ÍNDICE es la secuencia índice. Por tanto, el cebador tiene la secuencia CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCA-GACGTGTGCTCTTCCGATC TGTTACCTTGCCCCACAGGGCAGTAT (SEQ ID No: 11), pero con una secuencia índice insertada entre los nucleótidos 24 y 25 de esa secuencia.

Amplicón 2:

digSF_seq

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
ATCTGCAACCTCAAACAGACACCAT (SEQ ID No: 12).

R2_seq

5 Un cebador que comprende la SEQ ID No: 18 unida por una secuencia índice a la SEQ ID No: 19, teniendo las SEQ ID No: 18 y 19 las siguientes secuencias:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[SEQ ID NO:18]

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTACCTTGCCCCACAGGGCA
GTA[SEQ ID NO:19].

10 Por tanto, el cebador tiene la fórmula SEQ ID NO: 18-ÍNDICE-SEQ ID NO:19, donde INDICE es la secuencia índice. Por tanto, el cebador tiene la secuencia CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCA-
GACGTGTGCTCTTCCGATC GTTACCTTGCCCCACAGGGCAGTA (SEQ ID No: 13), pero con una secuencia
índice insertada entre los nucleótidos 24 y 25 de esa secuencia.

15 Amplicón 3:

digSF_seq

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC
TGCAACCTCAAACAGACACCAT (SEQ ID No: 14).

20 digSR_seq

Un cebador que comprende la SEQ ID No: 20 unida por una secuencia índice a la SEQ ID No: 21, teniendo las SEQ ID No: 20 y 21 las siguientes secuencias:

25 CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[SEQ ID NO: 20]
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCCACAGGGCAGTAACG [SEQ ID NO:21].

Por tanto, el cebador tiene la fórmula SEQ ID NO: 20-ÍNDICE-SEQ ID NO:21, donde INDICE es la secuencia índice. Por tanto, el cebador tiene la secuencia CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGT-
30 GTGCTCTTCC GATCTCCCCACAGGGCAGTAACG (SEQ ID No: 15), pero con una secuencia índice insertada entre
los nucleótidos 24 y 25 de esa secuencia.

También se proporcionan cebadores con cualquiera de los niveles de identidad de secuencia especificados anteriormente para: (a) SEQ ID No: 10; (b) SEQ ID NO:16-ÍNDICE-SEQ ID NO:17; (c) SEQ ID No: 12; (d) SEQ ID
35 NO:18-ÍNDICE-SEQ ID NO:19; (e) SEQ ID NO 14; o (f) SEQ ID NO:20-ÍNDICE-SEQ ID NO:21. Con respecto al
cebador SEQ ID NO:16-ÍNDICE-SEQ ID NO:17, los inventores describen el cebador con cualquier secuencia
adecuada como la secuencia índice (ÍNDICE), incluyendo todas las permutaciones del cebador, incluyendo la
secuencia índice mencionada anteriormente, es decir, SEQ ID NO:16-ÍNDICE-SEQ ID NO:17 donde la secuencia
40 índice es una cualquiera de Índice 6, Índice 12, Índice 4, Índice 5 o Índice 7, así como cebadores con los niveles de
identidad de secuencia especificados anteriormente y/o cambios de secuencia en dichos cebadores. La invención
también proporciona dichos cebadores para las SEQ ID NO:18-ÍNDICE- SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20-ÍNDICE-SEQ
ID NO:21.

Los inventores también describen un conjunto de cebadores que comprenden cebadores con la secuencia de SEQ ID
45 NO:18-ÍNDICE-SEQ ID NO:19, pero con un cebador para cada permutación de al menos cinco secuencias índice
diferentes. Los inventores también describen dichos cebadores para cada uno de los cebadores (a) SEQ ID NO:17-
ÍNDICE-SEQ ID NO:18; (b) SEQ ID NO:19-ÍNDICE-SEQ ID NO:20; y (c) SEQ ID NO:20-ÍNDICE-SEQ ID NO:21.
Cualquiera de los cebadores tratados en el presente documento puede proporcionarse con una secuencia índice, tal
50 como cualquiera de las secuencias índice específicas tratadas en el presente documento. Los adaptadores
específicos, índices y/o sitios de unión a la secuencia tratados en el presente documento, incluyendo los específicos,
pueden estar presentes en los cebadores usados para la segunda PCR. Por ejemplo, dichas secuencias se pueden
emplear cuando la segunda PCR es para una afección diferente a la de células falciformes y, por tanto, se usan

diferentes amplicones.

En un caso preferido, los cebadores para la segunda PCR comprenden la secuencia de los cebadores para la primera PCR, más dichas secuencias adicionales, por ejemplo añadida como se muestra para los cebadores específicos tratados en el presente documento.

Cualquiera de los conjuntos de cebadores tratados en el presente documento y los kits pueden comprender los cebadores para cada permutación de un cebador con una pluralidad de secuencias índice y, en particular, las secuencias índice tratadas en el presente documento.

Amplificación

En un método de la invención, se utiliza un procedimiento de amplificación para amplificar a partir de la muestra materna para producir el ácido nucleico para una eventual secuenciación. El procedimiento de amplificación empleado es la PCR. En un caso, la PCR empleada no es una PCR digital.

Como se ha mencionado anteriormente, se realiza una PCR de dos etapas. Por ejemplo, se realiza una primera PCR con los pares de cebadores iniciales y luego se utiliza una muestra del producto de amplificación como molde para una segunda amplificación con los segundos pares de cebadores. En un caso preferido adicional, la primera PCR se realiza con un número relativamente bajo de ciclos, por ejemplo con menos de 25, 20, 19, 18, 17, 16 o 15 ciclos, preferentemente con 16, 17 o 18 ciclos y, en particular, con 17 ciclos. En un caso, la PCR inicial puede tener de 15 a 20 ciclos, preferentemente de 16 a 19 ciclos, más preferentemente 17 o 18 ciclos.

En algunos casos, la segunda PCR puede realizarse con el mismo o diferente número de ciclos que la primera amplificación, por ejemplo, en un caso, la segunda PCR se puede realizar con un mayor número de ciclos que la primera PCR, tal como con, por ejemplo, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 ciclos. En un caso, la segunda PCR puede tener de 20 a 30 ciclos, preferentemente, de 22 a 28 ciclos y, en particular, de 24 a 26 ciclos. En un caso preferido, se puede emplear cualquier combinación del número de ciclos para la PCR inicial y la segunda PCR especificada anteriormente, por ejemplo, en un caso, la PCR inicial tiene de 15 a 20 ciclos y la segunda PCR de 20 a 30 ciclos, en un caso preferido, la PCR inicial puede tener de 16 a 18 ciclos y la segunda PCR de 23 a 27 ciclos.

Preferentemente, la primera y segunda PCR se diseñarán con el objetivo de que el producto de amplificación final sea lo más representativo posible de la muestra inicial, particularmente, en términos de la proporción de ADN materno a ADN fetal. Tal como se analiza en el presente documento, también se puede emplear un análisis adicional, tal como el uso de un marcador fetal específico, para confirmar la presencia de ADN fetal.

Puede usarse cualquier polimerasa adecuada en la amplificación, preferentemente, la polimerasa es una con una tasa de error baja. Un ejemplo preferido de una polimerasa que se puede emplear es la polimerasa Pwo. Por ejemplo, en un caso, en la amplificación se utiliza una concentración final de aproximadamente 240 nmol/l para cada cebador y aproximadamente 0,1 U/μl de ADN polimerasa Pwo (Roche), preferentemente en las dos etapas de amplificación.

Se puede emplear cualquier condición de ciclo adecuada en la PCR y las condiciones se pueden adaptar a los cebadores específicos empleados. En un caso, los ciclos en la PCR inicial son de 2 a 4 minutos y, preferentemente, de 3 minutos, con una temperatura de 90 °C a 98 °C, preferentemente de 92 °C a 96 °C y, en particular, aproximadamente 94 °C. Por ejemplo, en un caso, las condiciones de ciclado para la PCR primaria pueden ser de 94 °C durante 3 minutos, realizándose cualquiera de los números de ciclos mencionados anteriormente y, en particular, realizándose aproximadamente 17 ciclos.

En otro caso, las condiciones de ciclado para la segunda PCR pueden ser: (a) de 90 °C a 98 °C, preferentemente de 92 °C a 96 °C y, en particular, de aproximadamente 94 °C, por ejemplo, de 30 a 60 segundos, preferentemente, de 45 a 50 segundos; seguido de (b) de 52 °C a 58 °C, preferentemente de 54 °C a 56 °C a, por ejemplo, de 30 a 60 segundos, preferentemente, de 45 a 50 segundos; seguido de (c) de 68 °C a 76 °C, preferentemente, de 70 °C a 74 °C, por ejemplo, de 45 a 90 segundos, preferentemente, de 50 a 70 segundos. En algunos casos, cualquiera de los números de ciclos especificados anteriormente se puede emplear en la segunda PCR, en particular de 25 a 30 ciclos. En un caso preferido, dichas condiciones se emplean con los cebadores tratados en el presente documento para la detección de anemia de células falciformes.

En un caso preferido, las condiciones de ciclado empleadas son 94° C durante 3 minutos, luego 17 ciclos (PCR primaria); 25 ciclos o 30 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 56 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 1 minuto seguido de 72 °C durante 10 minutos (PCR secundaria). Dichas condiciones se emplean en un caso para el procedimiento de detección de anemia falciforme analizado en el presente documento y, en particular, para los cebadores específicos tratados en el presente documento para ese propósito, aunque en general también pueden usarse las condiciones de ciclado. En un caso, cuando el procedimiento se emplea para la anemia de células falciformes, particularmente cuando se utilizan los cebadores para lo tratado en el presente documento, en la segunda PCR se utilizan 25 ciclos para el Amplicón 3 y 30 ciclos para el Amplicón 1 y 2 en la PCR secundaria.

En un caso particularmente preferido, cada amplicón puede amplificarse en reacciones separadas. Por ejemplo, la primera y la segunda PCR para cada amplicón se pueden realizar por separado de las de los otros amplicones. En algunos casos, los amplicones se amplifican juntos.

5 *Secuenciación y análisis de muestras*

Los procedimientos de la invención comprenden, preferentemente, productos de secuenciación de la segunda PCR.

10 En un caso, después de la amplificación, en particular después de la primera y segunda PCR, la muestra se puede purificar para ayudar en el análisis posterior. La muestra se puede analizar para ayudar a normalizar todas las muestras a la misma molaridad. Por ejemplo, se puede utilizar un kit de purificación de PCR MinElute para la limpieza de muestras y/o se puede utilizar un kit de bioanálizador de ADN 2100 de Agilent Technologies para la normalización de las concentraciones de ADN en las muestras. No obstante, se puede emplear cualquier abordaje adecuado en dicha limpieza y normalización.

15 Las muestras pueden agruparse antes de la secuenciación. Por ejemplo, cuando los cebadores llevan un índice/código de barras específico para un amplicón y/o paciente significa que las muestras agrupadas pueden secuenciarse juntas. Por ejemplo, todos los amplicones generados pueden agruparse y secuenciarse. En algunos casos, las muestras pueden agruparse de 1 a 10, de 2 a 8, de 3 a 6 y, en particular, 5 muestras de pacientes. En algunos casos, todos los amplicones de este número de pacientes pueden agruparse antes de la secuenciación.

25 En un caso particularmente preferido de la invención, se añade un control a la muestra para su análisis. Por ejemplo, se puede añadir una biblioteca de control, por ejemplo, para aumentar la diversidad. En un caso preferido, la biblioteca de control será de un organismo con un genoma pequeño, contenido de GC:AT diverso y/o secuencia genómica bien definida, preferentemente, que tenga al menos una de esas características, más preferentemente al menos dos y aún más preferentemente al menos. En un caso, la biblioteca de control es de un virus, particularmente un virus con un genoma pequeño, preferentemente con las características mencionadas anteriormente. En un caso preferido, el uso de una biblioteca de control ayuda a evitar la secuenciación de baja diversidad. En un caso especialmente preferido, la biblioteca de control es de la biblioteca PhiX, un ejemplo de una biblioteca PhiX que puede emplearse es la de 30 Illumina, por ejemplo, el control Illumina PhiX versión 3 con un tamaño de inserto de 425-525 bases. No obstante, puede emplearse cualquier biblioteca adecuada que introduzca diversidad.

35 En un caso preferido, el procedimiento de la invención comprende secuenciar una pluralidad de productos de un amplicón. Ello significa que normalmente es posible analizar la incidencia de un alelo o mutación particular en la población secuenciada de productos de PCR. Preferentemente, determinando la divergencia del genotipo materno es posible determinar si el feto tiene un trastorno y, en particular, es posible determinar el genotipo del feto. En un caso, se pueden secuenciar al menos 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 o más productos para cada amplicón. En algunos casos, el número de productos secuenciados es de al menos 100.000, al menos 500.000, al menos un millón, al menos dos millones, al menos cinco millones, al menos siete millones o más. En algunos casos, el número de productos 40 secuenciados es de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 15 millones, preferentemente de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 12 millones, más preferentemente de aproximadamente un millón a diez millones de productos. En algunos casos adicionales, el número de secuencias de productos es de aproximadamente un millón a aproximadamente siete millones y, en particular, de aproximadamente dos millones a aproximadamente cinco millones. En algunos casos, se secuencian hasta los números especificados anteriormente.

45 Puede emplearse cualquier técnica de secuenciación adecuada, particularmente aquellas que permitan la secuenciación simultánea de una pluralidad de moléculas, incluidas las que permiten un rendimiento alto y un rendimiento ultraalto. En un caso especialmente preferido, se emplea una técnica de secuenciación de próxima generación (NGS) para realizar la secuenciación.

50 Los ejemplos de técnicas de secuenciación que pueden emplearse incluyen:

- secuenciación por pirosecuenciación, por ejemplo, el sistema de síntesis Roche/454;
- secuenciación basada en fluorescencia, tal como la secuenciación de Illumina o la secuenciación de Intelligent Biosystems;
- secuenciación de Ion Torrent (detección de iones H⁺);
- secuenciación de una sola molécula por fluorescencia, tal como la secuenciación de Heliscope;
- Matriz de ADN Nanoball con secuenciación CPAL (ligamiento de anclaje de sonda combinatoria);
- secuenciación genómica completa;
- secuenciación por ligamiento, tal como SOLiD (basado en Polony); y
- secuenciación en tiempo real de una sola molécula (SMRT) tal como la secuenciación de Pac Bio;

Más ejemplos de posibles abordajes de secuenciación que pueden emplearse, incluyen:

- 65 • secuenciación mediante microscopía electrónica - Electron Optica, ZS Genetics;
- secuenciación por síntesis (registro de pH y/o temperatura), tal como la secuenciación de Genapsys;

- Nanoporos, en estado biológico y sólido, tales como los sistemas de Genia, IBM/Roche,

ONT, Nabsys, Noblegen;

- 5 • secuenciación por hibridación - tal como el sistema de GnuBio;
- obtención de imágenes ópticas - tal como la secuenciación de Lightspeed Genomics;
- detección de carga en un Nanowire - tal como la secuenciación de Quantum Dx;
- microscopía de fuerza atómica - tal como el sistema de secuenciación Reveo; y
- 10 • secuenciación por expansión - tal como el sistema de Stratos Genomics.

10 En una realización especialmente preferida, la técnica de secuenciación se basa en terminadores de colorante reversibles y/o polimerasas modificadas genéticamente y, en particular, es la secuenciación de Illumina. En la secuenciación de Illumina, normalmente se unen moléculas individuales de ADN a una superficie plana, se amplifican *in situ* y se usan como moldes para secuenciación sintética con desoxirribonucleótidos terminadores reversibles

15 fluorescentes. A continuación, se pueden analizar imágenes de la superficie para generar una secuencia.

En un caso preferido adicional, se emplea un secuenciador de sobremesa y, en particular, uno que realiza NGS y, preferentemente, uno que realiza secuenciación de Illumina. Los ejemplos ilustrativos de secuenciadores que pueden emplearse incluyen el HiSeq 2500/1500, HiSeq 2000/1000, el analizador del genoma Illumina y el Illumina Miseq.

20 Puede emplearse cualquier secuenciador adecuado.

Preferentemente, la secuenciación empleada es subgenómica, en particular, la secuenciación está normalmente restringida a los amplicones o regiones dentro del amplicón y, por lo tanto, preferentemente solo se secuencia una región relativamente pequeña que abarca el sitio de mutación en lugar de secuenciar grandes longitudes de secuencia.

25 Al enfocar la secuenciación en regiones específicas en dichas realizaciones, el abordaje general es, típicamente, más asequible y también más accesible para una mayor variedad de laboratorios, en lugar de estar disponible solo en unos pocos establecimientos especializados. Por ejemplo, la longitud de la región secuenciada puede ser, por ejemplo, cualquiera de las longitudes especificadas en el presente documento, en un caso, el tamaño de la región secuenciada puede ser inferior a 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb o 300 pb. En algunos casos, el tamaño de la región secuenciada es inferior a 250 pb, 200 pb, 150, 125 pb, 100 pb o 90 pb. Sin embargo, el tamaño de la región secuenciada puede variar, por ejemplo, si las mutaciones que se buscan se extienden a una distancia mayor, aunque en algunos casos se pueden emplear múltiples amplicones para cubrir las regiones relevantes del gen, por ejemplo, cuando hay un pequeño número de mutaciones diferentes para detectar. La longitud total cubierta por los amplicones y, por tanto, la secuencia de la región, puede ser, en algunos casos, inferior a 500 pb, inferior a 400 pb, inferior a 250 pb, inferior a

30 200 pb de longitud o por debajo de cualquiera de las otras longitudes especificadas en el presente documento.

Los datos de secuencia obtenidos se analizan mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, el análisis normalmente permitirá que las secuencias se asignen a un amplicón y/o paciente en particular, a continuación, puede determinarse la proporción global de secuencias dentro de cada amplicón.

40 Por ejemplo, se puede emplear un script Perl para analizar los datos. Las secuencias índice se pueden utilizar para clasificar las lecturas de extremos de pares en las muestras, las secuencias índice/códigos de barras también pueden usarse para clasificarlos en amplicones y/o pacientes específicos. A modo de ilustración, en el procedimiento para la anemia de células falciformes ilustrado, los índices se utilizan para clasificar cada lectura de extremo pareado en las muestras, después, usando la etiqueta de identificación del amplicón de 2 pb, las lecturas se dividieron en los 3 amplicones, según las siguientes reglas: el amplicón 1 secuenciado de 84 pb comienza con las bases AC; el amplicón 2 termina con las bases TC; y el amplicón 3 termina con las bases AC. Utilizando el mismo script Perl, se interrogaron ambas lecturas para encontrar 3 variantes en el fragmento de ADN secuenciado colocado en las coordenadas 5.248.232; 5.248.233; 5.248.243. Un abordaje de este tipo puede emplearse para la detección de células falciformes.

50 En un caso preferido, el procedimiento permite distinguir el alelo HbS y los alelos HbA de tipo silvestre. En un caso preferido adicional, la secuenciación permite distinguir los alelos HbS, HbC y HbA entre sí. En un caso preferido adicional, el procedimiento permite distinguir los alelos HbS, HbC, HbE y HbA entre sí. Por lo tanto, en un caso, los amplicones abarcarán el codón del sexto aminoácido de la cadena de la beta-globina y, en otros, al menos uno de los amplicones también abarcará los codones 26 y 27. El procedimiento identifica, preferentemente, el genotipo del feto.

55 En una realización preferida, el grado de diferencia en la incidencia de un alelo particular será del 0,5 a 7 % más alto de lo esperado, por ejemplo del 1 % al 4 %, en algunos casos, del 2 al 3 % y puede ser aproximadamente un 2 % diferente de lo que se esperaría de la muestra materna por sí sola.

60 El uso de una pluralidad de amplicones también se puede emplear como control, ya que la comparación de los datos de cada uno se puede utilizar para corroborar adicionalmente los resultados de cada amplicón individual. Por ejemplo, los datos de una pluralidad de amplicones que abarcan el sitio de mutación pueden compararse y, en un caso preferido, se asigna un diagnóstico del trastorno en el feto donde una pluralidad y, preferentemente, todos esos amplicones

En un caso preferido adicional, el análisis también puede tener en cuenta, opcionalmente, las diferencias en las secuencias entre dos fragmentos de ADN que dan una eficacia de PCR ligeramente diferente y, por tanto, diferencias en el número de copias generadas a partir de cada fragmento de ADN después de la PCR. Si se observa, entonces se puede usar un factor de sesgo para corregir el recuento de alelos.

Por ejemplo, se amplifica una muestra portadora, tal como una muestra de AS, que, por definición, tiene una proporción 1:1 de A a S, el número esperado de lecturas A y S es 50:50. Si se ve una desviación de esa proporción, por ejemplo, si se observa de forma consistente un 48 % de lecturas A y un 52 % de lecturas S para un amplicón en particular, hay un 2 % de sesgo a favor del alelo S para ese amplicón en particular, lo que permite la corrección usando el factor de sesgo del 2 % para corregir los datos de la prueba.

Por lo tanto, en un caso, el procedimiento empleado puede comprender realizar una amplificación en una muestra con una relación alélica conocida para determinar si existe dicho factor de sesgo y, después, corregir, preferentemente, los resultados obtenidos basándose en el factor de sesgo observado. En un caso, dicho control se puede realizar para uno de los amplicones empleados, preferentemente para dos, más preferentemente para tres de los amplicones y, más preferentemente, para todos los amplicones empleados.

En un caso, puede ser que ya se conozca algún factor de sesgo para una muestra en particular y se tenga en cuenta al analizar los resultados obtenidos. En otros casos, la realización de dicho control para determinar el factor de sesgo puede ser parte del procedimiento de la invención y, en un caso, dichas amplificaciones de control para determinar el factor de sesgo pueden realizarse en paralelo en la muestra de prueba.

En un caso preferido, el procedimiento empleado puede comprender las etapas indicadas en la Figura 4. En un caso preferido adicional, el análisis de secuencia puede comprender las etapas indicadas en la Figura 5.

La referencia al singular en el presente documento también abarca el plural, a menos que se excluya específicamente. Cuando se hace referencia a un valor, también se desvela el empleo de "aproximadamente" dicho valor. En los casos en que en el presente documento se hace referencia a "que comprende" o similar, también se proporcionan realizaciones que consisten o que consisten esencialmente en lo que se especifica.

Ejemplos

Procedimientos

Selección y procesamiento de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de mujeres a las que se les realizaron pruebas de diagnóstico invasivas para la anemia de células falciformes. Las pruebas de diagnóstico de las muestras invasivas se llevaron a cabo en el University College Hospital de Oxford o en el National Haemoglobinopathy Reference Laboratory, también en Oxford. Todas las mujeres dieron su consentimiento para el uso de su sangre o ADN en la investigación científica.

Se recogió sangre materna completa (entre 2 y 11,5 ml) en tubos que contenían EDTA. El plasma se separó de la sangre mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se transfirieron alícuotas de 1 ml de sobrenadante en tubos de 1,5 ml (eppendorf) y se centrifugaron de nuevo a 7.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, el plasma se almacenó en alícuotas de 800 µl a -80 °C hasta la extracción del ADN.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de 1, 2 o 3 ml de plasma con el kit QIAmp Circulating Nucleic Acid (Qiagen). Las extracciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un colector de vacío de Qiagen. Las muestras se eluyeron en 70 µl de tampón AVE.

Determinación de la concentración de ADN plasmático y la fracción fetal

Siempre que se disponía de suficiente material, la concentración de ADN se evaluó mediante un ensayo de PCR en tiempo real para detectar RASSF1A, un marcador universal de ADN fetal. Este procedimiento permite calcular la fracción fetal. El procedimiento utilizado fue el mismo que se describe en White et al (2012), Evaluation of a Novel Assay for Detection of the Fetal Marker RASSF1A: Facilitating Improved Diagnostic Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. PLoS ONE 7(9): e45073. doi:10.1371/journal.pone.0045073. En los casos en que no se dispusiera de cantidades significativas de ADN, las muestras de ADN se cuantificaron utilizando el kit de ensayo Qubit dsDNAHS (Life Technologies).

Selección de cebadores

Se diseñaron seis cebadores directos y seis inversos para amplificar la mutación de células falciformes en el gen HBB. Se evaluó la especificidad y la eficiencia de las 36 combinaciones posibles utilizando técnicas estándar de biología

molecular (los tamaños de los fragmentos variaron de 66 pb a 148 pb). Los pares de mejor rendimiento se evaluaron adicionalmente utilizando ADN diluido en serie para seleccionar los tres conjuntos de cebadores más sensibles. Los conjuntos de cebadores se resumen a continuación y los amplicones en la Figura 1.

Set 1: 872_HBS_F4 (SEQ ID No:1) + 875_HBS_R2 (SEQ ID No:2)

5 Set 2: 879_digSickleF (SEQ ID No:3) + 875_HBS_R2 (SEQ ID No:2)

Set 3: 879_digSickleF (SEQ ID No:3) + 880_disgSickleR (SEQ ID No:4)

872_HBS_F4	ACTAGCAACCTCAAACAGACACCATG (SEQ ID No:1)
875_HBS_R2	GTTACCTTGCCCCACAGGGCAGTA (SEQ ID No:2)
879_digSickleF	GCAACCTCAAACAGACACCAT (SEQ ID No: 3)
880_disgSickleR	CCCCACAGGGCAGTAACG (SEQ ID No:4)

10 Siempre que hubiera suficiente ADN, se usaron los tres conjuntos de cebadores para preparar tres amplicones separados de cada muestra de ADN plasmático. Los tres amplicones se superponen a la misma región del gen HBB (véase la Figura 1).

Amplificación primaria y preparación de bibliotecas

15 Se realizó una amplificación por PCR de un solo plex de dos etapas para reducir la pérdida alélica. Durante la primera PCR, se utilizaron los tres conjuntos de cebadores en una breve amplificación. Después de esta preamplificación, se realizó una segunda PCR para conectar los adaptadores apropiados, los sitios de unión de los cebadores y los códigos de barras esenciales para la secuenciación (véase la Figura 2)

20 En la segunda PCR, los adaptadores Illumina específicos necesarios para la generación de grupos y los sitios de unión del cebador de secuenciación se unen al final de los cebadores directo e inverso. Se incluye una secuencia adicional en el cebador inverso, un "código de barras" que genera una etiqueta única para cada amplicón. Este código de barras tiene una longitud de 6 pb y se utilizaron cinco códigos de barras diferentes que permitían la secuenciación del mismo amplicón para tres pacientes diferentes en la misma ejecución (véase la Figura 2).

25 Por lo tanto, el primer par de cebadores empleado fue:

Cebador directo:

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT
CT (SEQ ID NO: 22)

30

Cebador inverso:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGA
TCT (SEQ ID NO: 23)

35

La secuencia índice se añadió entre los nucleótidos 24 y 25 de la secuencia del cebador inverso anterior.

Índice6: ATTGGC (SEQ ID NO: 5)

40 Índice12: TACAAG (SEQ ID NO: 6)

Índice4: TGGTCA (SEQ ID NO: 7)

Índice5: CACTGT (SEQ ID NO: 8)

45

Índice7: GATCTG (SEQ ID NO: 9)

De forma global: los tres pares de cebadores para la segunda PCR fueron los siguientes:

50 Amplicón 1:

F4_seq

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
ATCTACTAGCAACCTCAAACAGACACCATG (SEQ ID No: 10)

R2_seq

5 CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTGTTACCTT-
GCCCCACAGGGCAGTA (SEQ ID No: 11) donde se añadió una secuencia índice entre los nucleótidos 24 y 25 de la
secuencia del cebador inverso.

Amplificación 2:

10 digSF_seq

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
ATCTGCAACCTCAAACAGACACCAT (SEQ ID No: 12).

15 R2_seq

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTGTTACCTT-
GCCCCACAGGGCAGTA (SEQ ID No: 13) donde se añadió una secuencia índice entre los nucleótidos 24 y 25 de la
secuencia del cebador inverso.

20 Amplificación 3:

digSF_seq

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC
TGCAACCTCAAACAGACACCAT (SEQ ID No: 14).

25 digSR_seq

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC
GATCTCCCCACAGGGCAGTAACG (SEQ ID No: 15) donde se añadió una secuencia índice entre los nucleótidos 24
y 25 de la secuencia del cebador inverso.

30 Dependiendo del número de muestras procesadas en la ejecución, estos índices siempre se usaron en el mismo orden
para permitir suficiente diversidad durante la secuenciación.

35 La PCR primaria se llevó a cabo en un volumen total de 100 µl y contenía 10 µl de ADN plasmático. A continuación,
se usaron 2,5 µl de producto de PCR primario como molde en la segunda reacción. Para ambas amplificaciones se
utilizó una concentración final de 240 nmol/l para cada cebador y 0,1 U/µl de ADN polimerasa Pwo (Roche) con 2X
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix.

40 Las condiciones de ciclado fueron 94 °C durante 3 minutos, luego 17 ciclos (PCR primaria); 25 ciclos (Amplificación 3 en
la PCR secundaria) o 30 ciclos (Amplificación 1 y 2 en la PCR secundaria) de 94 °C durante 45 segundos, 56 °C durante
45 segundos y 72 °C durante 1 minuto, seguido de 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR obtenidos tenían
205 pb de longitud para el amplificador 1, 203 pb para el amplificador 2 y el amplificador 3 era de 191 pb. Finalmente, para
comprobar la calidad del producto, se ejecutó un gel al 3 %.

45 *Limpieza y cuantificación de la biblioteca de ADN*

Después de la amplificación, cada muestra se purificó utilizando el kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen)
utilizando una microcentrifuga de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyó en 20 µl de tampón EB (Tris-
Cl 10 mM, pH 8,5).

Se utilizó una alícuota de 1 µl para la cuantificación de la biblioteca con el kit de bioanalizador de ADN 2100 (realizado
de acuerdo con las instrucciones del fabricante). En resumen, la molaridad de las muestras se evaluó en el
electroferograma utilizando el pico específico del amplificador (entre 150 y 250 pb). Después, cada muestra se diluyó en
55 Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 + Tween 20 al 0,1 %, hasta una concentración de reserva de 2 nM. A continuación, para la
ejecución, las muestras se combinaron en la preparación.

Ejecución

Se secuenciaron hasta cinco muestras en una ejecución, de tres amplicones cada una. Se prepararon reservas de biblioteca 2 nM y se combinaron volúmenes iguales de las muestras. Para ayudar a garantizar un buen rendimiento y datos de alta calidad, la biblioteca combinada se mezcló con la biblioteca de control PhiX para evitar la secuenciación de baja diversidad. La preparación de las bibliotecas y la concentración de carga utilizada fueron las mismas que las especificadas en la guía del usuario del sistema Miseq.

Se realizó una secuenciación de extremos emparejados utilizando un MiSeq (illumina): Se secuenciaron 84 bases desde ambos extremos de los fragmentos de ADN (véase la Figura 3).

Análisis de datos

Los datos se obtuvieron en forma de archivos FASTQ y se analizaron utilizando un script Perl.

Usando los cinco índices, cada lectura de extremos emparejados se clasificó en muestras. Y usando una etiqueta de identificación de amplicón de 2 pb, las lecturas se dividieron en los 3 amplicones, según las siguientes reglas: el amplicón 1 secuenciado de 84 pb comienza con las bases AC; el amplicón 2 termina con las bases TC; y el amplicón 3 termina con las bases AC.

Usando el mismo script de Perl, ambas lecturas se interrogaron para encontrar tres variantes en el fragmento de ADN secuenciado colocado en las coordenadas 5.248.232; 5.248.233; 5.248.243. Dos posibilidades para cada variante dan como resultado 8 secuencias diferentes (véase la Figura 3). El número de variantes de tipo silvestre y mutante se contó y se incrementó para calcular los porcentajes.

TABLA 1

AMPLICÓN 1		Sp-02	
Mutación	SV	MT	porcentaje
cr11/5.248.232	555,225	474.912	44,3
cr11: 5,248,233	1.012.182	47.955	4,5
cr11/5.248.243	2.143	1.057.994	99,8
AMPLICÓN 2			
Mutación	SV	MT	porcentaje
cr11/5.248.232	423.481	346.117	45,0
cr11: 5,248,233	734.886	34.712	4,5
cr11/5.248.243	1.929	767.669	99,7
AMPLICÓN 3			
Mutación	SV	MT	porcentaje
cr11/5.248.232	535,131	458.345	46,1
cr11: 5,248,233	954.365	40.111	4,0
cr11:5,248,243	183	994.293	100,0

Los resultados ilustran que es posible genotipar un feto usando el procedimiento de la invención.

Derivación del factor de sesgo A/B

Las posibles diferencias en las secuencias entre dos fragmentos de ADN que pueden, en algunos casos, conducir a una eficiencia de la PCR ligeramente diferente y también se pueden tener en cuenta diferencias notables en el número de copias generadas de cada fragmento de ADN después de la PCR para ayudar a mejorar aún más los resultados obtenidos. Dichas diferencias posiblemente dan como resultado un sesgo hacia uno u otro alelo (factor de sesgo del alelo A/B). El factor de sesgo puede usarse para corregir el recuento de alelos experimentales para ayudar a refinar aún más los resultados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ISIS INNOVATION LIMITED

<120> ENSAYO

<130> N119094A-WO

<140> tbc

<141> 14/03/2014

<150> GB1304810.3

<151> 15/03/2013
 <160> 41
 5 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 872_HBS_F4
 15 <400> 1
 actagcaacc tcaacagac accatg 26
 <210> 2
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 875_HBS_R2
 25 <400> 2
 gttcaccttg cccacaggg cagta 25
 <210> 3
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador 879_digSickleF
 <400> 3
 gcaacctcaa acagacacca t 21
 40 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador 80_disgSickleR
 <400> 4
 cccacaggg cagtaacg 18
 50 <210> 5
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia índice 6
 <400> 5
 60 attggc 6
 <210> 6
 <211> 6
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 814 964 T3

<220>
 <223> Secuencia índice 12

 5 <400> 6
 tacaag 6

 <210> 7
 <211> 6
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia índice 4

 15 <400> 7
 tggta 6

 <210> 8
 <211> 6
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia índice 5
 25 <400> 8
 cactgt 6

 <210> 9
 30 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Secuencia índice 7

 <400> 9
 gatctg 6

 40 <210> 10
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador F4_seq

 <400> 10

 aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttcctac acgacgctct tccgatctac 60

 tagcaacctc aaacagacac catg 84
 50

 <210> 11
 <211> 83
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador R2_seq

 60 <400> 11

ES 2 814 964 T3

	caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggagttcaga cgtgtgctct tccgatctgt	60
	tcaccttgcc ccacagggca gta	83
5	<210> 12 <211> 79 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador digSF_seq <400> 12	
	aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttccctac acgacgctct tccgatctgc	60
	aacctcaaac agacaccat	79
15	<210> 13 <211> 83 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador R2_seq <400> 13	
	caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggagttcaga cgtgtgctct tccgatctgt	60
25	tcaccttgcc ccacagggca gta	83
30	<210> 14 <211> 79 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador digSF_seq <400> 14	
35	aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttccctac acgacgctct tccgatctgc	60
	aacctcaaac agacaccat	79
40	<210> 15 <211> 76 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador digSR_seq <400> 15	
	caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggagttcaga cgtgtgctct tccgatctcc	60
50	ccacagggca gtaacg	76
	<210> 16	

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Parte del cebador R2_seq
 <400> 16
 caagcagaag acggcatacg agat 24
 10 <210> 17
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Parte del cebador R2_seq
 <400> 17
 20 gtgactggag ttcagacgtg tgctcttcg atctgttcac ctgccccac agggcagta 59
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Parte del cebador R2_seq
 30 <400> 18
 caagcagaag acggcatacg agat 24
 <210> 19
 <211> 59
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Parte del cebador R2_seq
 40 <400> 19
 gtgactggag ttcagacgtg tgctcttcg atctgttcac ctgccccac agggcagta 59
 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Parte del cebador digSR_seq
 50 <400> 20
 caagcagaag acggcatacg agat 24
 <210> 21
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Parte del cebador digSR_seq
 <400> 21
 60 gtgactggag ttcagacgtg tgctcttcg atctccccac agggcagtaa cg 52
 65 <210> 22

	<211> 58		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador directo citado en Ejemplos		
	<400> 22		
10	aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgacgtct tccgatct 58		
	<210> 23		
	<211> 58		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador inverso citado en Ejemplos		
	<400> 23		
20	caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggagttcaga cgtgtgctct tccgatct 58		
	<210> 24		
	<211> 91		
	<212> ADN		
25	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 24		
	gttcactagc aacctcaaac agacaccatg gtgcatctga ctctgagga gaagtctgcc	60	
	gttactgccc tgtggggcaa ggtgaacgtg g	91	
30	<210> 25		
	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Amplicón 1		
	<400> 25		
40	ctcttccgat ctactagcaa cctcaaacag acaccatggt gcacttgact cctgaggaga	60	
	agtctgccgt tactgccctg tggggcaagg tgaacagatc ggaagag	107	
	<210> 26		
	<211> 107		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Amplicón 1 (complementario)		
50	<400> 26		
	ctcttccgat ctgttcacct tgccccacag ggcagtaacg gcagacttct cctcaggagt	60	
	cagatgcacc atgggtgtctg tttgaggttg ctagtagatc ggaagag	107	
55	<210> 27		

ES 2 814 964 T3

	<211> 105		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Amplicón 2		
	<400> 27		
	ctcttccgat ctgcaacctc aaacagacac catggtgcat ctgactcctg aggagaagtc	60	
10	tgccgttact gccctgtggg gcaagggtgaa cagatcggaa gagca	105	
	<210> 28		
	<211> 105		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Amplicón 2 (complementario)		
20	<400> 28		
	tgctcttccg atctgttcac cttgccccac agggcagtaa cggcagactt ctcctcagga	60	
	gtcagatgca ccatggtgtc tgtttgaggt tgcagatcgg aagag	105	
	<210> 29		
25	<211> 115		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Amplicón 3		
	<400> 29		
	ccctacacga cgctcttccg atctgcaacc tcaaacagac accatggtgc atctgactcc	60	
	tgaggagaag tctgccgtta ctgccctgtg gggagatcgg aagagcacac gtctg	115	
35	<210> 30		
	<211> 115		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Amplicón 3 (complementario)		
	<400> 30		
45	cagacgtgtg ctcttccgat ctccccacag ggcagtaacg gcagacttct cctcaggagt	60	
	cagatgcacc atggtgtctg tttgaggttg cagatcggaa gagcgtcgtg taggg	115	
	<210> 31		
	<211> 84		
50	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		

<400> 31

actagcaacc tcaaacagac accatggtgc atctgactcc tgaggagaag tctgccgtta 60

ctgccctgtg gggcaaggtg aaca 84

5

<210> 32

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios

15

<400> 32

ggtgcatctg actcctgagg agaagtctgc 30

<210> 33

<211> 30

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios

25

<400> 33

ggtgcacctg actcctgagg agaagtctgc 30

<210> 34

<211> 30

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios

35

<400> 34

ggtgcatctg actcctaagg agaagtctgc 30

<210> 35

40

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios

<400> 35

ggtgcacctg actcctaagg agaagtctgc 30

50

<210> 36

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios

<400> 36

60

ggtgcatctg actcctgtgg agaagtctgc 30

<210> 37

<211> 30

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios	
	<400> 37	
	ggtgcacctg actcctgtgg agaagtctgc 30	
10	<210> 38	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios	
	<400> 38	
20	ggtgcatctg actcctatgg agaagtctgc 30	
	<210> 39	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Alelo resultante de la variación en 3 sitios	
	<400> 39	
30	ggtgcacctg actcctatgg agaagtctgc 30	
	<210> 40	
	<211> 84	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Amplicón 2, figura 6	
40	<400> 40	
	gcaacctcaa acagacacca tgggtgcatct gactcctgag gagaagtctg ccggttactgc	60
	cctgtggggc aaggtgaaca gatc	84
45	<210> 41	
	<211> 84	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Amplicón 3, figura 6	
	<400> 41	
	gcaacctcaa acagacacca tgggtgcatct gactcctgag gagaagtctg ccggttactgc	60
	cctgtgggga gatcgggaaga gcac	84
55		

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección prenatal para un trastorno recesivo y/o un trastorno causado por una mutación puntual, que comprende:
 - (a) amplificar una región que abarca el sitio de una mutación responsable del trastorno, realizándose la amplificación en una muestra de ADN obtenida de una gestante que comprende ADN materno y fetal; y
 - (b) secuenciar una pluralidad de productos de la amplificación y determinar si el alelo mutante está representado o no con una frecuencia diferente de la esperada del genotipo de la gestante únicamente, en el que la amplificación se realiza mediante una PCR de dos etapas, donde la primera etapa amplifica el amplicón de interés y la segunda etapa introduce secuencias adicionales que no están presentes en el molde.
2. El método de la reivindicación 1, en el que:
 - (a) la muestra de ADN se ha obtenido de una muestra de sangre, donde la sangre: se ha (i) centrifugado en un plazo de aproximadamente ocho horas desde la obtención de la muestra; y/o (ii) se ha recogido en un tubo que comprende un conservante que reduce la degradación del ácido nucleico libre de células; y/o
 - (b) la muestra de ADN es, o comprende, ADNlc.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que se amplifica una pluralidad de amplicones que abarcan el sitio de mutación, preferentemente cuando se amplifican tres de dichos amplicones.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (a) el o los productos de amplificación se secuencian usando secuenciación de próxima generación (NGS);
 - (b) todos los amplicones se localizan dentro del gen responsable del trastorno; y/o
 - (c) las reacciones de secuenciación incluyen secuencias PhiX como control.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el trastorno que se detecta es anemia de células falciformes.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (a) el procedimiento no comprende la escisión con enzimas de restricción;
 - (b) el procedimiento no comprende la escisión con enzimas de restricción con una enzima de restricción de Tipo IIS;
 - (c) el procedimiento no comprende la escisión con enzimas de restricción para identificar la variación de la secuencia localizada en el sitio de escisión con enzimas de restricción;
 - (d) el procedimiento no comprende el uso de rellenar un saliente de un sitio de escisión con enzimas de restricción para determinar la información de la secuencia y, en particular, no comprende rellenar un saliente en 5';
 - (e) en el procedimiento se aplican al menos dos, tres o todos de (a) a (d).
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento comprende secuenciar una región de al menos 25, 50, 75, 100, 150 o más bases de longitud.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento:
 - (a) no comprende emplear un inhibidor de la lisis celular que comprende un aldehído y, en particular, no comprende emplear un inhibidor de la lisis celular que comprende glutaraldehído, un derivado del glutaraldehído, formaldehído, un derivado del formaldehído; o
 - (b) comprende emplear un tampón de lisis celular que comprende un aldehído y, en particular, no comprende emplear un inhibidor de lisis celular que comprende glutaraldehído, un derivado del glutaraldehído, formaldehído, un derivado del formaldehído.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (a) el procedimiento comprende añadir EDTA a la sangre materna después de la obtención de la sangre; o
 - (b) el procedimiento se realiza con sangre fijada.
10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además determinar un factor de sesgo para la amplificación y aplicar el factor de sesgo para corregir el recuento de alelos.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el factor de sesgo se determina realizando una amplificación en una muestra con una proporción alélica conocida.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el factor de sesgo se determina amplificando una

pluralidad de amplicones en la muestra y comparando los datos de la pluralidad de amplicones para determinar la proporción alélica final.

(A)

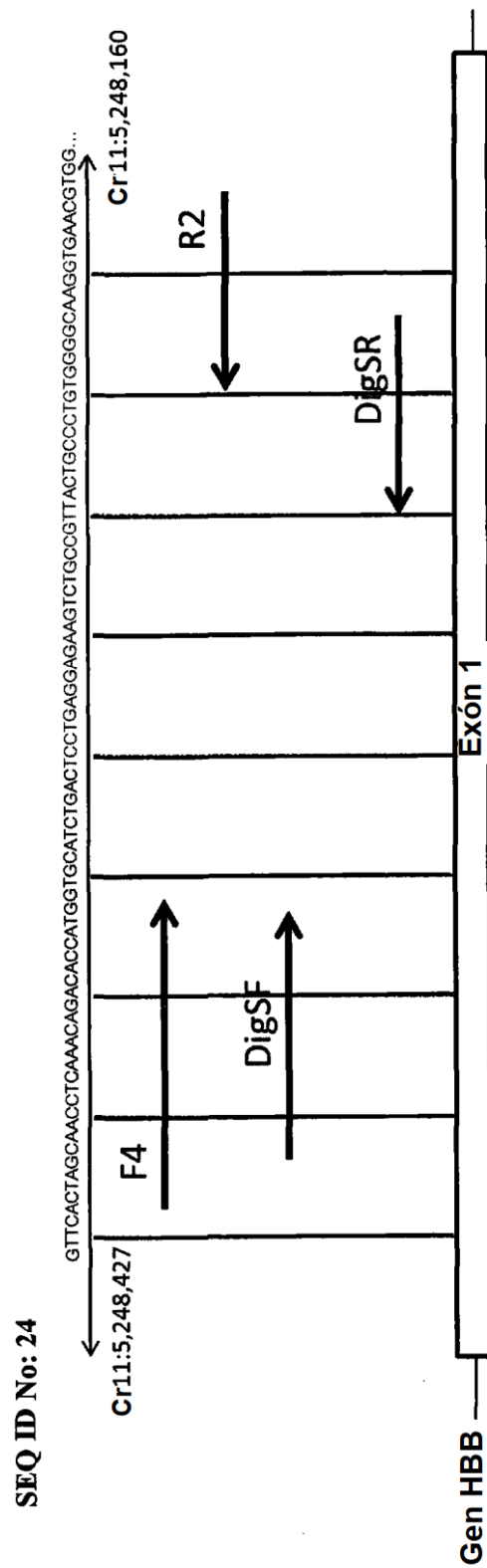


FIGURA 1

(B)

SEQ ID No: 24

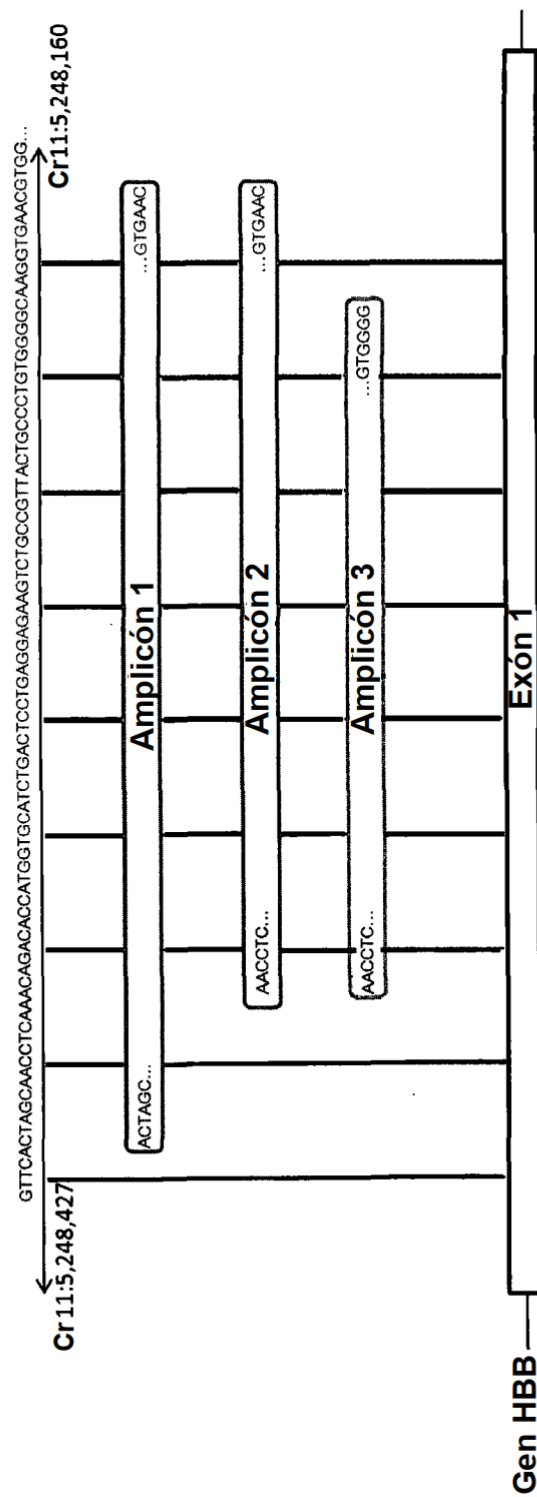
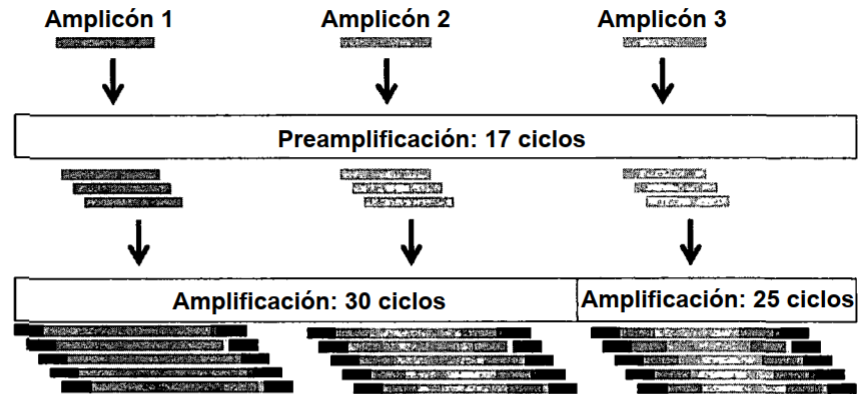


FIGURA 1 (continuación)

(A)



(B)

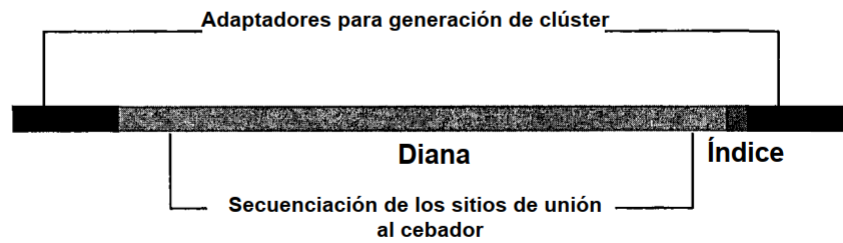


FIGURA 2

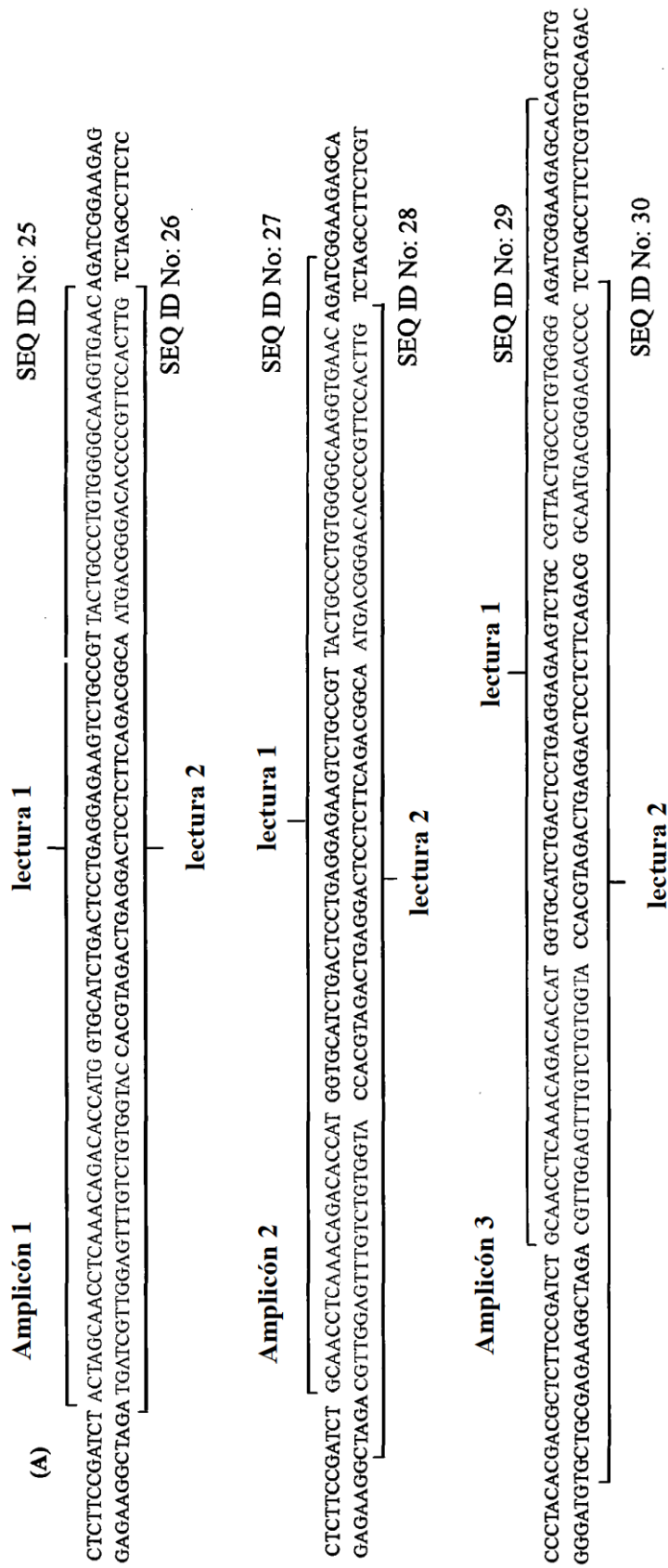


FIGURA 3

(B)

SEQ ID No: 31

ACTAGCAACCTCAAACAGACACACCATGGTGCATCTGACTCCT**GA**GGAGAAAGTCTGGCGGTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACA
(Mutante) C AT

SEQ ID No: 32	GGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAAGTCTGC
33	GGTGCA CC TGACTCCTGAGGAGAAAGTCTGC
34	GGTGCATCTGACTCCT AA GGAGAAAGTCTGC
35	GGTGCA CC TGACTCCT AA GGAGAAAGTCTGC
36	GGTGCATCTGACTCCTGTGGAGAAAGTCTGC
37	GGTGCA CC TGACTCCTGTGGAGAAAGTCTGC
38	GGTGCATCTGACTCCT AT GGAGAAAGTCTGC
39	GGTGCA CC TGACTCCT AT GGAGAAAGTCTGC

FIGURA 3 (continuación)

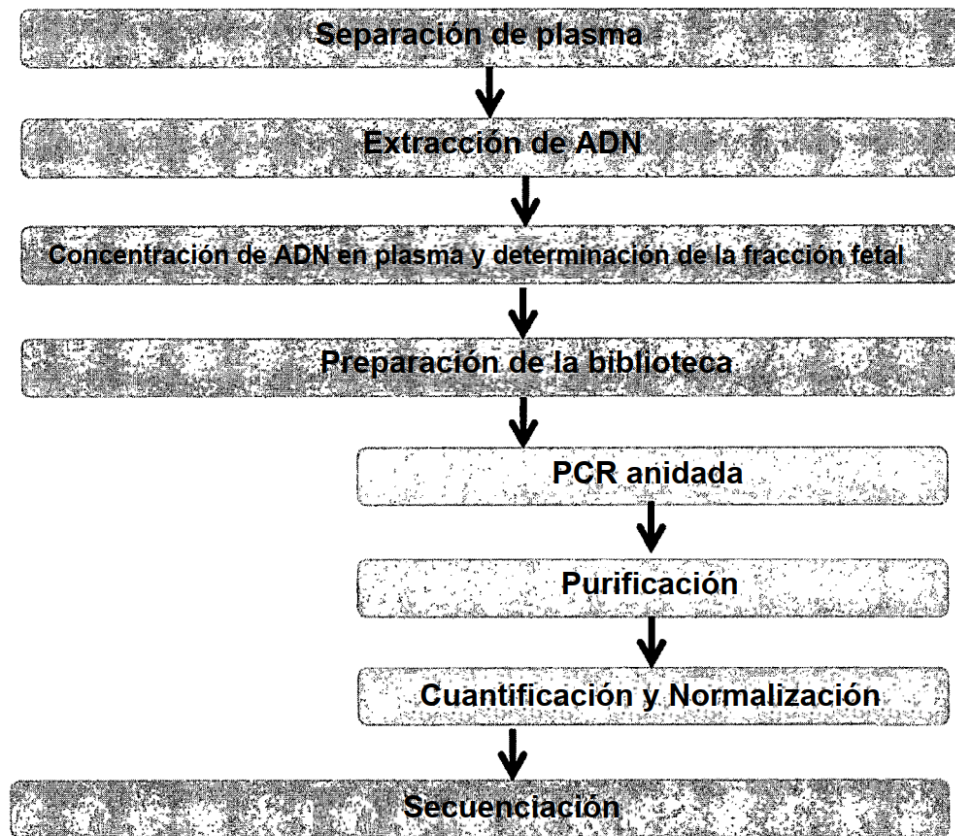


FIGURA 4

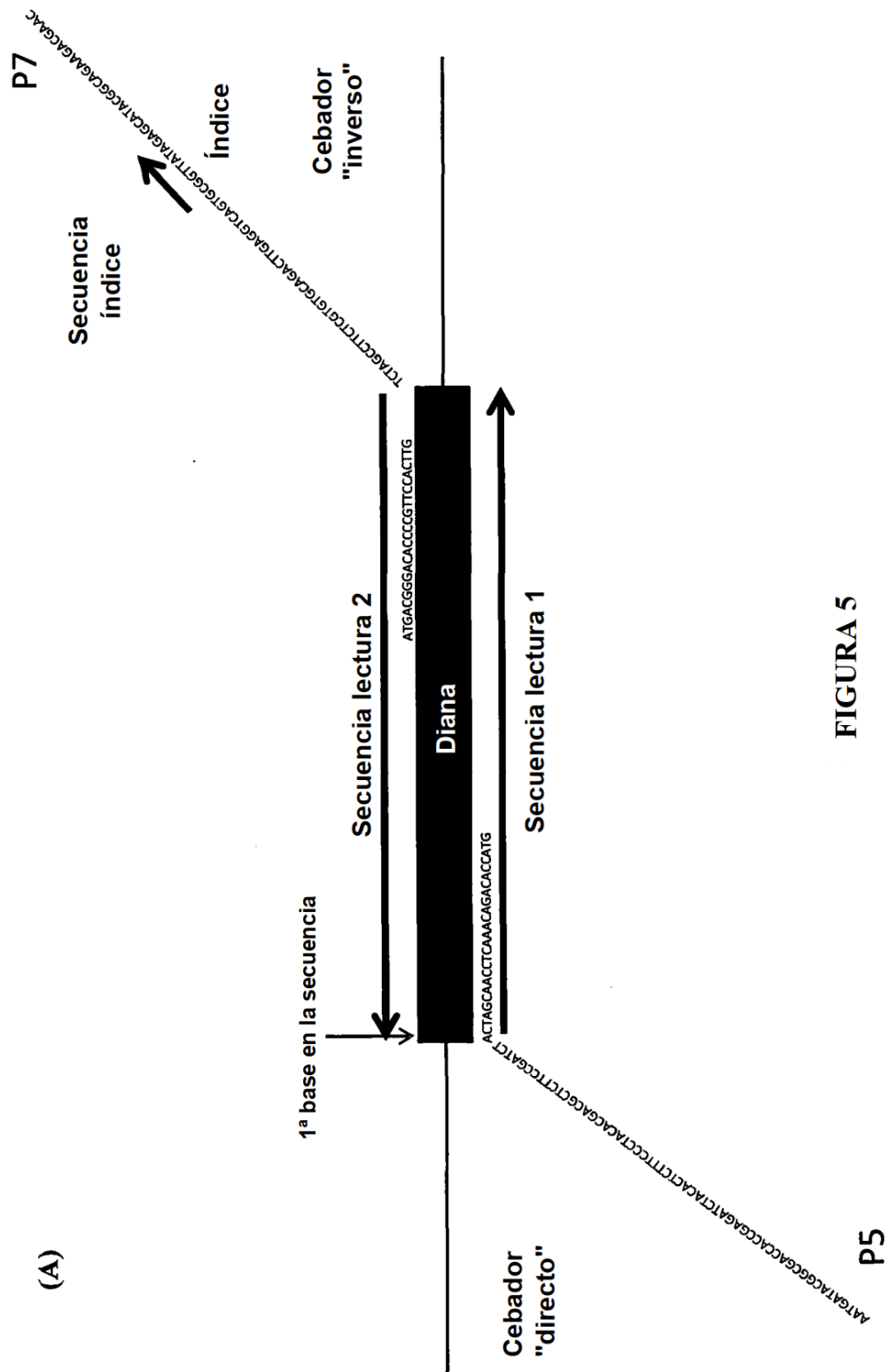


FIGURA 5

(B)

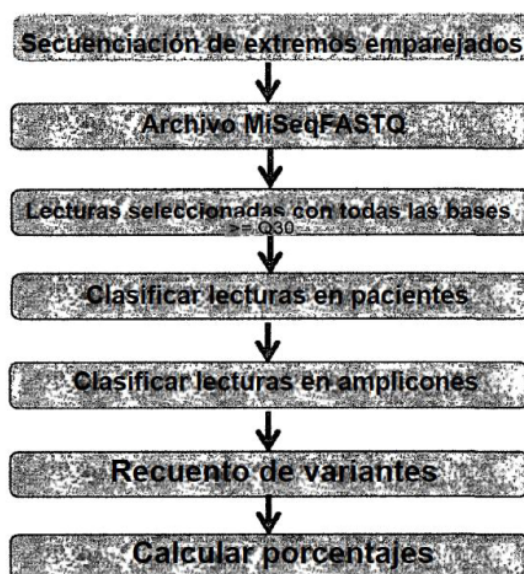


FIGURA 5 (continuación)

Clasificar lecturas en amplicones

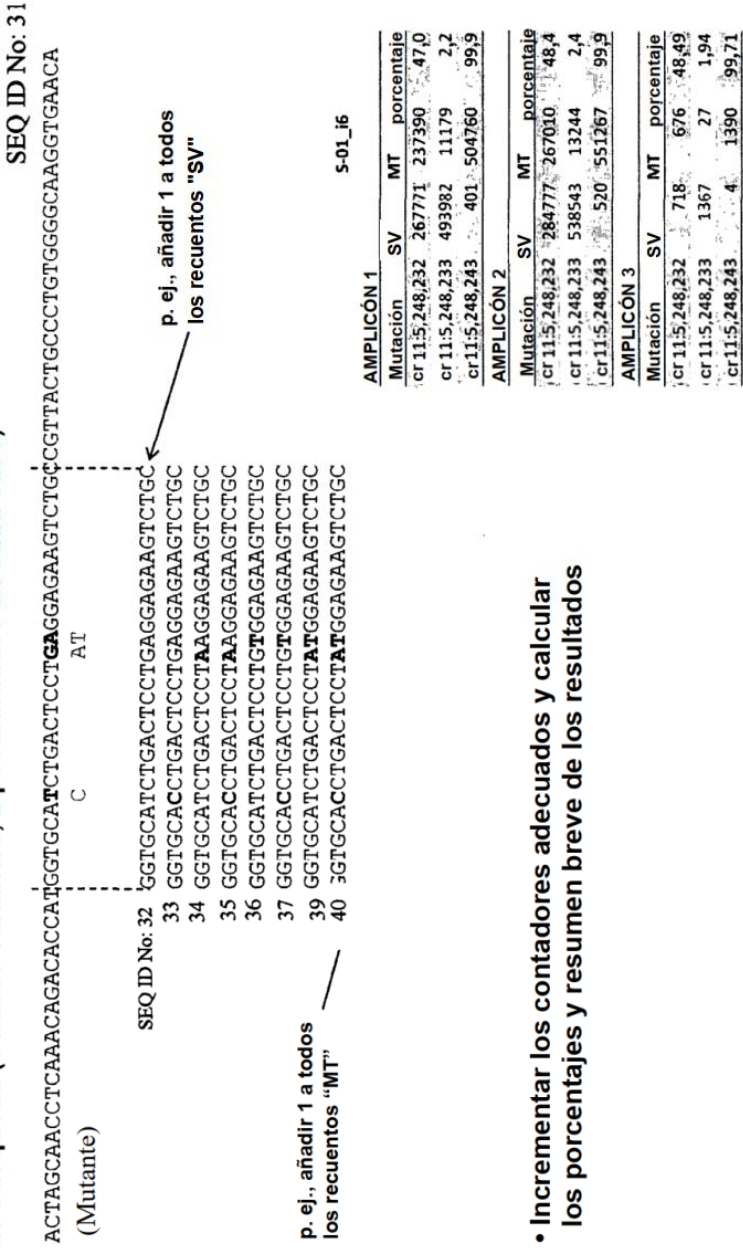
- Buscar en lectura 1 la ID de la etiqueta del amplicón de 2 pb
 1. El Amplicón 1 comienza con AC
 2. El Amplicón 2 termina con TC
 3. El Amplicón 3 termina con AC

Amplicón 1	SEQ ID No: 31
<u>ACT</u> AGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCA <u>TCT</u> GACTCCT <u>GAG</u> GGAGAAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACA	
Amplicón 2	SEQ ID No: 40
GCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCA <u>TCT</u> GACTCCT <u>GAG</u> GGAGAAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACAGATC	
Amplicón 3	SEQ ID No: 41
GCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCA <u>TCT</u> GACTCCT <u>GAG</u> GGAGAAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGAGATCGGAAGAGCAC	

FIGURA 6

Recuento de variantes

- Buscar en lectura 1 y lectura 2 una coincidencia con una de 8 cadenas de búsqueda (3 bases variantes, 2 posibilidades en cada caso)



- Incrementar los contadores adecuados y calcular los porcentajes y resumen breve de los resultados

FIGURA 6 (continuación)