



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1421211 E**

(51) Classificação Internacional:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.08.30**

(30) Prioridade(s): **2001.08.31 US 0944951**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.05.26**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.02.14**
003/2007

(73) Titular(es):

**THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG
ROOM 226, PI CH'IU BUILDING, SHATIN, NEW
TERRITORIES HONG KONG SAR CN**

(72) Inventor(es):

**YUK MING DENNIS LO CN
LIT MAN POON CN**

(74) Mandatário:

**PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADN PROVENIENTE DE INDIVÍDUOS DIFERENTES**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADN PROVENIENTE DE INDIVÍDUOS DIFERENTES"

Num primeiro aspecto, a presente invenção apresenta métodos para diferenciação de espécies de ADN provenientes de indivíduos diferentes, numa amostra biológica. Estes métodos podem ser utilizados para diferenciar ou detectar ADN fetal numa amostra materna ou para diferenciar ADN de um dador de órgão de ADN de um receptor de órgão. Em formas de realização preferidas, as espécies de ADN são diferenciadas por observação das diferenças epigenéticas nas espécies de ADN, tais como diferenças na metilação de ADN. Num segundo aspecto, a presente invenção apresenta métodos de detecção de anomalias genéticas num feto através da detecção de ADN fetal numa amostra biológica obtida de uma mãe. Num terceiro aspecto, a presente invenção apresenta métodos para diferenciar espécies de ADN provenientes de um dador de órgão daquelas de um receptor de órgão. Num quarto aspecto, a presente invenção apresenta *kits* para diferenciar espécies de ADN provenientes de indivíduos diferentes, numa amostra biológica.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADN PROVENIENTE DE INDIVÍDUOS DIFERENTES"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presença de ADN proveniente de fluidos corporais de indivíduos diferentes é um fenómeno biológico bem conhecido em muitos cenários clínicos e biológicos. Por exemplo, a seguir ao transplante de medula óssea, o sistema hemopoiético do receptor do transplante consistirá de várias proporções de células do dador e do receptor. A determinação da quantidade de células do dador ou do receptor foi realizada através da detecção de diferenças gráficas entre o dador e receptor, incluindo o género (Mangioni *et al.*, *Bone Marrow Transplant* 20:969-73 (1997)) e polimorfismos de ADN (Roux *et al.*, *Blood* 79:2775-83 (1992)). O corolário desta abordagem é que se a região analisada não suportar uma diferença genética entre o dador e o receptor, então a análise através da abordagem corrente não será possível.

Noutro exemplo, durante a gravidez, a detecção de ADN fetal em plasma e soro materno foi demonstrada anteriormente (Lo *et al.*, *Lancet* 350:9076: 485-7 (1997)). Esta tecnologia demonstrou que o ADN fetal isolado a partir de plasma e soro materno pode ser utilizado para diagnóstico pré-natal não-invasivo (Lo *et al.*, *N Eng J Med*, 339(24):1734-8 (1998); Faas *et al.*, *Lancet* 352(9135):1196 (1998); Amicucci *et al.*, *Clin Chem* 46(2):301 (2000); Chen *et al.*, *Prenat Diagn* 20(4):355-7 (2000); Saito *et al.*, *Lancet* 356:1170 (2000)). A aplicação clínica deste fenómeno

foi auxiliada pelas concentrações absolutas e relativas relativamente elevadas de tal ADN fetal circulante no plasma e soro materno (Lo et al., *N Eng J Med*, 62:768-775 (1998)). Utilizando esta abordagem, foi alcançada a detecção pré-natal não-invasiva de uma variedade de estados, incluindo o estado rhesus D fetal (Lo et al., *New Eng J Med*, 339:1734-1738 (1998)), distrofia miotónica (Amicucci et al., *Clin Chem* 46:301-302 (2000)), acondroplastia (Saito et al., *Lancet* 356:1170(2000)) e certas translocações cromossómicas (Chen et al., *Prenat Diag* 20:335-357 (2000); Chen et al., *Clin Chem* 47:937-939 (2001)). Todas estas abordagens correntes utilizaram a detecção de sequências de ADN herdadas do pai e que são distinguíveis geneticamente a partir da mãe (Bianchi, *Am J Hum Genet* 62(4):763 (1998). De um modo específico, foi julgada ser impossível a detecção de ADN que o feto herdou da mãe no plasma ou soro materno. Foram também descritas limitações similares para a detecção de células nucleadas fetais isoladas a partir da fracção celular do sangue materno (Lo et al., *Ann N Y Acad Sci*, 731:204 (1994)).

Foi detectado, por outros, ADM metilado de um modo aberrante a partir de doentes com cancro. Isto foi referido para doentes com uma variedade de cancros, incluindo cancro do pulmão (Esteller, et al., *Cancer Res* 59(1):67 (1999) e do fígado (Wong et al., *Cancer Res* 59(1):71 (1999)).

Recentemente, foi focado muito interesse na biologia de fenómenos epigenéticos, nomeadamente processos que alteram o fenótipo mas que não estão associados com mudanças na sequência de ADN (Wolffe, *Science* 286:481-486 (1999)). Um dos melhores processos epigenéticos caracterizados é a metilação de ADN (Wolffe et al., *Curr Biol.* 10:R463-R465 (1999)). Seria altamente

valioso um método para discriminar espécies de ADN provenientes de indivíduos diferentes em fluidos biológicos utilizando diferenças epigenéticas em vez de genéticas entre as espécies de ADN. Por exemplo, a detecção epigenética de ADN fetal numa amostra materna proporcionaria um avanço significativo permitindo métodos de rastreio e diagnóstico adicionais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num primeiro aspecto, a presente invenção caracteriza métodos para a diferenciação de espécies de ADN provenientes de indivíduos diferentes numa amostra biológica. Em formas de realização preferidas, os métodos da presente invenção são utilizados para diferenciar ou detectar ADN fetal numa amostra materna ou para diferenciar ADN de um dador de órgão a partir de ADN de um receptor de órgão.

Os especialistas na técnica entenderão que a amostra biológica obtida de um indivíduo seja recolhida a partir de qualquer amostra de fluido ou célula, contudo, em formas de realização preferidas, o fluido corporal é plasma ou soro. Em formas de realização preferidas, as espécies de ADN são diferenciadas através de observação de diferenças epigenéticas nas espécies de ADN, tais como diferenças na metilação do ADN. Por exemplo, em situações em que uma espécie de ADN provém de um indivíduo do sexo masculino e uma espécie de ADN provém de um indivíduo do sexo feminino, o marcador epigenético pode ser o cromossoma X inactivado do indivíduo do sexo feminino. Em tais formas de realização, as sequências de ADN metilado no cromossoma X inactivado podem ser utilizadas para detectar ADN proveniente do indivíduo do sexo feminino. Em algumas formas de

realização, as diferenças epigenéticas podem ser analisadas dentro das células. Além disso, em algumas formas de realização, as diferenças epigenéticas podem ser analisadas utilizando a reacção de polimerase em cadeia específica para metilação *in situ*. Adicionalmente, as diferenças epigenéticas podem ser utilizadas para seleccionar ou isolar células a partir dos respectivos indivíduos ou para purificar ADN a partir dos respectivos indivíduos. Os métodos, de acordo com a presente invenção, podem ser realizados com ou sem a medição das concentrações das espécies de ADN, contudo, em formas de realização preferidas, são medidas as concentrações das espécies de ADN com as diferenças epigenéticas respectivas. Tal medição das concentrações envolve a medição das respectivas diferenças de metilação do ADN em formas de realização em que as diferenças da metilação do ADN são o marcador epigenético. Em formas de realização especialmente preferidas, o bissulfito de sódio é adicionado directamente à amostra biológica ou às espécies de ADN para detectar as diferenças na metilação do ADN. Contudo, em outras formas de realização, uma reacção da polimerase em cadeia específica para metilação, tal como é bem conhecida dos especialistas na técnica, pode ser utilizada para detectar diferenças na metilação do ADN. Ainda em outras formas de realização, a sequenciação de ADN ou extensão do iniciador pode ser utilizada para detectar as diferenças de metilação.

Num segundo aspecto, a presente invenção apresenta métodos de detecção de anormalidades num feto através de detecção de ADN fetal numa amostra biológica obtida a partir de uma mãe. Os métodos de acordo com a presente invenção proporcionam a detecção de ADN fetal numa amostra materna através da diferenciação de ADN fetal do ADN materno baseado em marcadores epigenéticos, tais como diferenças na metilação do ADN.

Utilizando tais métodos, o ADN fetal que está previsto numa anomalia genética ou doença de base genética pode ser, deste modo, identificado, proporcionando métodos para diagnóstico pré-natal. Estes métodos são aplicáveis para quaisquer e todas as condições associadas à gravidez para as quais são identificadas mudanças na metilação associadas com um estado de doença. Doenças características que podem ser diagnosticadas incluem, por exemplo, pré-eclâmpsia, uma aneuploidia cromossómica, incluindo mas não estando limitada a trissomia 21, Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Angelman.

Tal como nos métodos de diferenciação mais alargados do primeiro aspecto da invenção, a amostra biológica obtida a partir da mãe é, de um modo preferido, plasma ou soro. A diferenciação entre ADN materno e fetal pode ser realizada com ou sem quantificar a concentração de ADN fetal no plasma ou soro materno. Em formas de realização em que o ADN fetal é quantificado, a concentração medida pode ser utilizada para prever, monitorizar, diagnosticar ou prognosticar um distúrbio associado com a gravidez. Em formas de realização preferidas, o marcador epigenético particular derivado do feto está associado com um distúrbio no feto e, em algumas formas de realização, é utilizada uma característica epigenética em células fetais na placenta como um marcador específico do feto no plasma ou soro materno.

Num terceiro aspecto, a presente invenção caracteriza métodos para diferenciação de espécies de ADN provenientes de um dador de órgão a partir daquelas de um receptor de órgão. Tal como nos métodos de diferenciação mais alargados do primeiro aspecto da invenção, a amostra biológica obtida é, de um modo preferido, plasma ou soro. A diferenciação entre ADN do dador de

órgão e receptor de órgão ou potencial dador de órgão e potencial receptor de órgão pode ser realizada com ou sem quantificação da concentração de ADN na amostra biológica. Esta forma de realização é particularmente útil em circunstâncias quando o transplante é um transplante de medula óssea. Tais medições podem ser utilizadas para prever o progresso clínico do receptor do transplante, em especial no que se refere à rejeição do órgão.

Num quarto aspecto, a presente invenção caracteriza *kits* para diferenciação de espécies de ADN provenientes de indivíduos diferentes numa amostra biológica. Tais *kits* são úteis, por exemplo, para diferenciar ou detectar a presença de ADN fetal numa amostra biológica materna ou para a diferenciação de ADN de um dador de órgão ou potencial dador de órgão daquele de um receptor de órgão ou potencial receptor de órgão. Os *kits* de acordo com a presente invenção compreendem um ou mais reagentes para determinar o estado da metilação do ADN materno, tal como bissulfito de sódio e ou mais reagentes para detectar a presença de ADN, tal como um gel. Adicionalmente, tais *kits* podem incluir um ou mais reagentes para amplificar a quantidade de ADN presente numa amostra, tais como um ou mais reagentes para realizar a amplificação por reacção de polimerase em cadeia. Tais reagentes são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Além disso, tais *kits* podem incluir um ou mais mecanismos para obter uma amostra de ADN materno. Tais mecanismos são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Em particular, os *kits* de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para diagnosticar uma doença causada totalmente ou em parte por uma anomalia genética, tais como uma mutação, substituição ou eliminação na totalidade ou em parte de uma sequência de ADN presente num feto. Doenças características que podem ser

diagnosticadas incluem, por exemplo, pré-eclâmpsia, uma aneuploidia cromossômica, incluindo mas não estando limitada a trissomia 21, Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Angelman.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 demonstra os resultados de um ensaio detectando sequências de ADN metiladas e não metiladas do gene do receptor de androgénio. No total, foram recrutados 6 sujeitos saudáveis masculinos e 11 femininos. De todos os sujeitos de controlo masculinos, apenas o gene do receptor de androgénio não metilado foi detectado nestas amostras como esperado (Fig. 1A). Em contraste, as sequências de ADN do gene do receptor de androgénio não metiladas e metiladas foram observadas nos sujeitos femininos de controlo (Fig. 1A). As taxas de detecção dos genes do receptor de androgénio metilados e não metilados nestes sujeitos femininos foram 100% e 82%, respectivamente. Quando as amostras de ADN foram omitidas do ensaio, não foi observado sinal positivo (Fig. 1A). De um modo interessante, foram observados sinais positivos para as sequências de ADN metiladas e não metiladas em todos os receptores de transplante de medula espinal com doadores femininos, indicando que existem na circulação sanguínea dos receptores masculinos, células de doadores femininos.

A Figura 2 proporciona uma representação esquemática da região metilada diferencialmente (DMR) da região *IGF2-H19* humana. São apresentadas as duas unidades de repetição de 450 pb (A1 e A2) e sete unidades de repetição de 400 pb (B1-B7). Os potenciais sítios de metilação na cadeia superior de ADN da região estudada estão representadas por círculos abertos. O

sítio (A/G) do polimorfismo num único nucleótido (SNP) estudado é indicado por uma caixa aberta. As setas abertas representam a localização dos iniciadores em sentido directo (for) e em sentido inverso (rev) nas reacções de PCR específicas para os alelos metilados (M) e não metilados (U), respectivamente. São apresentadas as sequências destes iniciadores MSP. As diferenças na sequência entre o ADN tratado e não tratado com bissulfito são destacadas em negrito e itálico e as diferenças da sequência entre ADN metilado (herdado do pai) e não metilado (herdado da mãe) são sublinhadas a negrito.

A Figura 3 demonstra a detecção de ADN metilado paterno no plasma materno do 3º trimestre (a) e 2º trimestre (b). São apresentadas amostras da sequência de ADN dos alelos metilados da camada leucoplaquetária materna (painel 1), camada leucoplaquetária ou fluido amniótico fetal (painel 2), plasma pré-natal materno (painel 3) e plasma maternal pós-natal (painel 4). A presença de ADN metilado fetal na amostra de plasma pré-natal materno é indicada por *. O sítio polimórfico (SNP) está representado em letras vermelhas.

A Figura 4 demonstra a detecção de ADN fetal não metilado (herdado maternalmente) em plasma materno. (a) Foram detectadas sequências de ADN não metiladas na camada leucoplaquetária materna (painel 1) e uma amostra materna do terceiro trimestre (painel 2) utilizando sequenciação directa. A presença de ADN fetal não metilado no plasma materno é indicado por *. (b) Foi detectado ADN fetal não metilado (seta) em duas amostras de plasma materno do terceiro trimestre utilizando o ensaio de extensão do iniciador. (c) Foi detectado ADN fetal não metilado (seta) numa amostra de plasma materno do segundo trimestre utilizando o ensaio de extensão do iniciador. São apresentados

os produtos das reacções de controlo contendo apenas iniciador, alelo G não metilado ou alelo A não metilado. Os tamanhos (nt) dos produtos da reacção estão representados no fundo. ●, iniciador não utilizado; □ alelo detectado.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO ESPECÍFICAS

Num primeiro aspecto, a presente invenção apresenta métodos para diferenciação de espécies de ADN provenientes de indivíduos diferentes numa amostra biológica. Em formas de realização preferidas, os métodos da presente invenção são utilizados para diferenciar ou detectar ADN fetal numa amostra materna ou para diferenciar ADN de um dador de órgão a partir de ADN de um receptor de órgão.

Os especialistas na técnica entenderão que a amostra biológica de um indivíduo seja recolhida a partir de qualquer amostra de fluido ou célula, contudo, em formas de realização preferidas o fluido corporal é plasma ou soro. Em formas de realização preferidas, as espécies de ADN são diferenciadas através da observação de diferenças epigenéticas nas espécies de ADN, tais como diferenças na metilação do ADN. Por exemplo, em situações onde uma espécie de ADN provém de um indivíduo masculino e uma espécie de ADN provém de um indivíduo feminino, o marcador epigenético pode ser o cromossoma X inactivado do indivíduo feminino. Em tais formas de realização, as sequências de ADN metilado do cromossoma X inactivado podem ser utilizadas para detectar ADN proveniente do indivíduo feminino. Em algumas formas de realização, as diferenças epigenéticas podem ser analisadas dentro das células. Além disso, em algumas formas de realização, as diferenças epigenéticas podem ser analisadas

utilizando reacção de polimerase em cadeia específica para metilação *in situ*. Adicionalmente, as diferenças epigenéticas podem ser utilizadas para seleccionar ou isolar células dos respectivos indivíduos ou para purificar ADN dos respectivos indivíduos. Os métodos de acordo com a presente invenção podem ser realizados com ou sem a medição das concentrações das espécies de ADN, contudo, em formas de realização preferidas, são medidas as concentrações das espécies de ADN com as respectivas diferenças epigenéticas. Tais medições das concentrações envolvem a medição das respectivas diferenças da metilação do ADN em formas de realização em que as diferenças de metilação do ADN são o marcador epigenético. Em formas de realização preferidas, o bissulfito de sódio é adicionado à amostra biológica ou às espécies de ADN directamente para detectar as diferenças de metilação do ADN. Contudo, em outras formas de realização, uma reacção de polimerase em cadeia específica para metilação, como é bem conhecida dos especialistas na técnica, pode ser utilizada para detectar diferenças na metilação do ADN. Ainda em outras formas de realização, a sequenciação de ADN ou extensão do iniciador podem ser utilizadas para detectar as diferenças de metilação.

Como aqui utilizado, é pretendido englobar com o termo "amostra biológica", qualquer amostra de fluido ou célula ou mistura destas, obtida a partir de um organismo vivo. De um modo específico, o termo inclui amostras de biópsia de tecidos, soro, plasma ou fluido amniótico.

Como aqui utilizado, é pretendido englobar com o termo "diferença epigenética", qualquer diferença molecular ou estrutural que não a sequência de nucleótidos primária. Por exemplo, isto pode incluir diferenças na metilação.

Como aqui utilizado, é pretendido englobar com o termo "ADN", qualquer sequência de mais de um nucleótido, tais como polinucleótidos, fragmentos de genes e sequências completas de genes.

Como aqui utilizado, o termo "PCR específico para metilação" é utilizado para descrever um método no qual o ADN é tratado com bissulfito de sódio e, depois, sujeito a amplificação por PCR. Esta técnica é baseada no princípio de que o tratamento de ADN com bissulfito resulta na conversão de resíduos de citosina não metilada em uracilo. Os resíduos de citosina metilada, por outro lado, permanecem não modificados. Assim, as sequências de ADN de regiões genómicas metiladas e não metiladas a seguir à conversão por bissulfito são diferentes e distinguíveis através de iniciadores de PCR específicos da sequência.

A presente invenção utiliza o fenómeno de "imprinting" genómico para ultrapassar as limitações da técnica anterior. No "imprinting" genómico as sequências de ADN são modificadas bioquimicamente, sem alteração na sequência de ADN. Se este processo resultar em modificação diferencial do ADN fetal ou materno, então esta diferença pode ser explorada para a discriminação de ADN fetal ou materno no plasma ou soro materno. Este fenómeno pode ser também utilizado para a discriminação de células fetais a partir de células maternas na fracção celular de sangue materno. Adicionalmente, este princípio pode também ser utilizado para detectar células maternas ou ADN que entrou no corpo do feto/bébé (Lo et al., *Blood* 88(11):4390-5 (1996); Lo, et al., *Clin Chem*, 46(9):1301-9 (2000); Maloney et al., *J Clin Invest* 104(1):41-7 (1999). Este fenómeno pode ser também

utilizado em muito outros cenários clínicos em que as células ou sequências de ADN são verificadas estarem presentes dentro do corpo de um indivíduo, tal como a seguir ao transplante de medula óssea (Lo et al., *Br J Haematol* 89(3):645-9 (1995)) ou transplante do órgão sólido (Starzl et al., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6(3):292-8 (1997); Lo et al., *Lancet* 351(9112):1329-30 (1998); Zhang, *Clin Chem* 45(10):1741-6 (1999)).

A presente invenção permite o desenvolvimento de um marcador para ADN fetal independente do género e independente do polimorfismo no plasma/soro materno. Para desenvolver um marcador fetal independente do género e independente do polimorfismo, podem ser utilizadas sequências de ADN que são, de um modo preferido e especificamente metiladas nos trofoblastos (Ohgane et al., *Dev Genet*, 22(2):132-40 (1998)). Isto ultrapassa a limitação corrente que apenas consegue detectar facilmente a presença de ADN de um feto masculino no plasma/soro da mãe (utilizando o cromossoma Y como o alvo) (Lo, et al., *Am J Hum Genet*, 62(4):768 (1998). Proporciona métodos de detecção em separado dos baseados nas diferenças das sequências no ADN fetal e materno para fazer tal distinção (Tang et al., *Clin Chem* 45(11):2033-5 (1999); Pertl et al., *Hum Genet* 106:45-49 (2000)).

O desenvolvimento de métodos de detecção molecular, tal como o PCR, proporcionou várias ferramentas poderosas para monitorizar o quimerismo a seguir ao transplante de medula óssea (BMT). Um dos testes baseados em PCR mais largamente utilizados para a detecção de quimerismo pós-BMT nos casos de desemparelhamento de sexo é o PCR, para sequências no cromossoma Y (Lo et al., *Br J Haematol* 89:645-9 (1995)). A limitação desta estratégia é que apenas pode ser utilizada em casos em que o dador é masculino e o receptor é feminino. A presente invenção

proporciona um sistema que pode ser aplicado a situações em que o dador é feminino e o receptor é masculino. O facto que o fenómeno de Lionização apenas existir em indivíduos femininos, pode ser explorado para desenvolver um marcador específico feminino. Neste fenómeno, um dos dois cromossomas X num indivíduo feminino é inactivado em genes inactivados aleatoriamente com metilação a ocorrer. Isto permite, por isso, um ensaio para detectar ADN feminino num excesso de ADN masculino e que pode ser aplicado a BMT com dadores femininos e receptores masculinos.

Num segundo aspecto, a presente invenção apresenta métodos de detecção de anormalidades num feto através da detecção de ADN fetal numa amostra biológica obtida a partir de uma mãe. Os métodos de acordo com a presente invenção proporcionam a detecção de ADN fetal numa amostra materna pela diferenciação de ADN fetal do ADN materno baseada em marcadores epigenéticos, tais como diferenças na metilação do ADN. Utilizando tais métodos, o ADN fetal que é previsível de uma anomalia ou uma doença pode ser deste modo identificado proporcionando métodos para o diagnóstico pré-natal. Estes métodos são aplicáveis para quaisquer e todas as condições associadas à gravidez para as quais são identificadas as mudanças na metilação associadas com o estado de doença. Doenças características que podem ser diagnosticadas incluem, por exemplo, pré-eclâmpsia, uma aneuploidia cromossómica, incluindo mas não estando limitada a trissomia 21, Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Angelman.

Tal como com os métodos de diferenciação mais abrangentes do primeiro aspecto da invenção, a amostra biológica obtida a partir da mãe é, de um modo preferido, plasma ou soro. A diferenciação entre ADN materno e fetal pode ser realizada com

ou sem quantificar a concentração de ADN fetal em plasma ou soro materno. Em formas de realização, em que o ADN fetal é quantificado, a concentração medida pode ser utilizada para prever, monitorizar ou diagnosticar um distúrbio associado à gravidez. Em formas de realização preferidas, um marcador epigenético particular derivado do feto está associado com um distúrbio fetal, e em algumas formas de realização é utilizada uma característica epigenética nas células fetais na placenta como um marcador específico do feto no plasma ou soro materno.

A presente invenção utiliza sequências de ADN fetal metiladas diferencialmente, que não necessitam de ser distinguíveis em termos de sequência de ADN do ADN materno, como marcadores para diagnóstico pré-natal não-invasivo. Esta nova abordagem pode converter os pares feto-mãe que não são informativos na abordagem convencional para serem informativos para o diagnóstico pré-natal. Assim, a presente invenção proporciona uma plataforma na qual uma nova geração de testes pré-natais não invasivos podem ser concebidos.

Os métodos da presente invenção estão baseados na detecção no plasma ou soro da mulher grávida de ADN metilado diferencialmente proveniente do feto. As sequências de ADN metiladas diferencialmente, que podem conter polimorfismo num único nucleótido, são detectadas, de um modo preferido, por reacção da polimerase em cadeia (PCR) específica para metilação; mas em princípio pode ser utilizado qualquer método de detecção para ADN metilado diferencialmente. Esta abordagem permite a utilização de marcadores de ADN fetal convencionais não informativos para o diagnóstico pré-natal.

A presente invenção permite a detecção ou previsão da presença de quaisquer distúrbios do feto ou da mãe que está associada com uma mudança no estado da metilação de uma sequência de ADN. Os exemplos incluem distúrbios no "imprinting", tais como síndrome de Prader-Willi (Kubota et al., *Nat Genet* 16(1):16-7 (1997)). A presente invenção proporciona um novo tipo de teste para a pré-eclâmpsia que foi sugerido ser um distúrbio de "imprinting" (Graves, *Reprod Fertil Dev* 10(1):23-9 (1998)). A presente invenção ainda proporciona um novo tipo de teste para aneuploidias cromossómicas, incluindo síndrome de Down (trisomia 21), que pode estar associado com mudanças na metilação (Yu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 94(13):6862-7 (1997)).

A presente invenção destaca-se utilizando as diferenças de metilação do ADN entre a mãe e o pai ultrapassando deste modo as limitações da técnica anterior na detecção de ADN fetal no plasma materno.

Num terceiro aspecto, a presente invenção apresenta métodos para diferenciar espécies de ADN provenientes de um dador de órgão a partir daquelas de um receptor de órgão. Tal como os métodos de diferenciação mais vastos do primeiro aspecto da invenção, a amostra biológica obtida é de um modo preferido plasma ou soro. A diferenciação entre ADN a partir do dador de órgão e receptor de órgão ou dador de órgão potencial e receptor de órgão potencial pode ser realizada com ou sem quantificar a concentração de ADN na amostra biológica. Esta forma de realização é particularmente útil em exemplos de quando o transplante é um transplante de medula óssea. Tais medições podem ser utilizadas para prever o progresso clínico do receptor

do transplante especialmente quando aplicado à rejeição de órgão.

Num quarto aspecto, a presente invenção apresenta *kits* para diferenciar espécies de ADN provenientes de indivíduos diferentes numa amostra biológica. Tais *kits* são úteis, por exemplo, para diferenciar ou detectar a presença de ADN fetal numa amostra biológica materna ou para diferenciar ADN de um dador de órgão ou potencial dador de órgão daquele de um receptor de órgão ou potencial receptor de órgão. Os *kits* de acordo com a presente invenção compreendem um ou mais reagentes para determinar o estado de metilação do ADN materno, tal como bissulfito de sódio e ou mais reagentes para detectar a presença de ADN, tal como um gel. Adicionalmente, tais *kits* podem incluir um ou mais reagentes para amplificar a quantidade de ADN presente na amostra, tal como um ou mais reagentes para realizar a amplificação por reacção de polimerase em cadeia. Tais reagentes são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Além disso, tais *kits* podem incluir um ou mais mecanismos para obter uma amostra de ADN materno. Tais mecanismos são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Em particular, os *kits* de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para diagnosticar uma doença causada na totalidade ou em parte por uma anomalia genética, tais como uma mutação, substituição ou deleção ou duplicação em toda ou parte de uma sequência de ADN presente num feto. As doenças características que podem ser diagnosticadas incluem, por exemplo, pré-eclâmpsia, uma aneuploidia cromossómica, incluindo mas não limitada à trissomia 21, Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Angelman.

EXEMPLO 1

Detecção de quimerismo pós-transplante de medula óssea através de abordagem epigenética

Materiais e Métodos

Sujeitos e Amostras

Foram seleccionados neste estudo quatro receptores masculinos de transplante de medula, que receberam medula óssea de dadores femininos, e 17 sujeitos saudáveis normais. A camada leucoplaquetária (BC) de todas as amostras de sangue com EDTA reunidas foi recolhida e armazenada a -20 °C como descrito (Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-75 (1998)).

Isolamento de ADN

O ADN foi extraído a partir de BC utilizando um *Kit* de Extração de ADN Nucleon (Scotlabs) de acordo com as recomendações do fabricante.

Conversão por bissulfito

A modificação por bissulfito das amostras de ADN foi realizada utilizando um *Kit* de Modificação de ADN CpGenome (Intergen) como indicado pelo fabricante. Com a conversão por bissulfito, os resíduos de citosina não metilados são convertidos a uracilo enquanto os resíduos de citosina metilados permanecem inalterados (Herman *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci USA*

93-9821-6(1996). A diferença da sequência entre o ADN metilado e não metilado a seguir à conversão pelo bissulfito é então distinguida utilizando iniciadores de PCR diferentes. Foi utilizado 1 µg de ADN de BC numa reacção de conversão pelo bissulfito.

PCR específico para metilação (MSP)

Os ensaios de MSP foram modificados a partir do protocolo como descrito por Herman *et al*, *supra*. Foram designados para a sequência metilada, os iniciadores M-for (5'-GCGACGGTAGTATTTTTTCGGC-3') e M-rev (5'-AACCAAATAACCTATAAAA-CCTCTACG-3'), enquanto que os iniciadores U-for (5'-GTTGTGAGTGTAGTATTTTTTGGT-3') e U-rev (5'-CAAATAACCTATAAAAACCTCTACA-3') foram designados para a sequência não metilada. Foram adicionados 5 µL de ADN tratado com bissulfito a 50 µL de reacção de PCR contendo 5 µL de tampão A TaqMan 10x (PE Applied Biosystems), MgCl₂ a 2 mM, 10 pmol de dNTPs, 20 pmol de cada um dos iniciadores de MSP correspondentes e 1,25 U de polimerase de ADN AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems). As misturas da reacção foram sujeitas a ciclos térmicos (alelo metilado: 95 °C durante 45 seg, 58 °C durante 30 seg, 72 °C durante 20 seg; alelo não metilado: 95 °C durante 45 seg, 50 °C durante 30 seg, 72 °C durante 20 seg) durante 45 ciclos, com um passo de desnaturação inicial de 8 min a 95 °C. Os produtos de PCR foram então analisados por electroforese em gel de agarose.

Resultados

Esta experiência proporciona um ensaio de MSP para detectar sequências de ADN metiladas e não metiladas do gene do receptor de androgénio. No total, foram seleccionados 6 indivíduos saudáveis masculinos e 11 femininos. De todos os sujeitos masculinos de controlo, apenas foi detectado nestas amostras o gene do receptor de androgénio não metilado, como esperado (Fig. 1A). Em contraste, ambas as sequências de ADN do gene do receptor de androgénio metiladas e não metiladas foram observadas nos sujeitos femininos de controlo (Fig. 1A). As taxas de detecção dos genes dos receptores de androgénio metilados e não metilados nestes sujeitos femininos foram de 100% e 82%, respectivamente. Quando as amostras de ADN foram omitidas do ensaio de MSP, não foi observado sinal positivo (Fig. 1A). De um modo interessante, foram observados sinais positivos para ambas as sequências de ADN metiladas e não metiladas em todos os receptores masculinos de transplante de medula óssea de sexo desemparelhado (100%), indicando que existem células do dador feminino na circulação sanguínea dos receptores masculinos.

Estes resultados demonstram, pela primeira vez que podem ser utilizados genes metilados no cromossoma X inactivado de indivíduos femininos como um marcador específico feminino na pesquisa de quimerismo. Este ensaio é também aplicável ao estudo de outros tipos de quimerismos pós-transplante envolvendo uma mistura de células ou ADN masculino ou feminino. Exemplos incluem quimerismo celular seguido de transplante de órgão sólido (Starz *et al.*, *Curr Opin Nephrol Hyperten* 6:292-8(1997)), quimerismo pós-transplante de ADN do plasma (Lo *et al.*, *Lancet* 351:1329-30 (1998)) e quimerismo do ADN na urina (Zhang *et al.*,

Clin Chem 45:1741-6(1995)). Adicionalmente, existe também um interesse muito recente na passagem de células e ADN da mãe para o feto durante a gravidez (Lo *et al.*, *Blood* 88:4390-5 (1996); Maloney *et al.*, *J Clin Invest* 104:41-7 (1999); Lo *et al.*, *Clin Chem* 46:1301-9 (2000). Os marcadores epigenéticos desenvolvidos também devem ser utilizados no quimerismo de origem materna em descendentes masculinos.

O ensaio corrente pode ser desenvolvido num formato quantitativo, utilizando por exemplo, tecnologia de PCR quantitativo (Lo *et al.*, *Cancer Res* 59:3899-903 (1999)). Tal desenvolvimento permitirá monitorizar os níveis de quimerismo de uma pessoa em particular. Clinicamente, tal ensaio pode possuir um papel na monitorização ou aceitação de transplante em BMT. No caso de quimerismo no ADN de urina ou plasma, tal ensaio pode também ser utilizado para monitorizar a rejeição do transplante.

EXEMPLO 2

Metilação de ADN diferencial entre o feto e a mãe como uma estratégia para detectar ADN fetal em plasma materno

A presente experiência demonstra que através da utilização de uma região metilada diferencialmente no locus *IGF2-H19* humano como um marcador epigenético no plasma materno, é possível a detecção de um alelo que o feto herdou da mãe. Estes resultados expandem grandemente as possibilidades de diagnóstico pré-natal do ADN fetal em plasma materno permitindo o desenvolvimento de um marcador específico de feto independente do género e polimorfismo em plasma materno e novas estratégias para o

diagnóstico pré-natal de distúrbios de "imprinting" e certas aneuploidias cromossómicas.

Materiais e Métodos

Sujeitos e Amostras

As amostras foram recolhidas de mulheres grávidas, com consentimento, após informação. Foram seleccionadas para este estudo, no total, 21 e 18 mulheres no segundo trimestre (17-21 semanas) e terceiro trimestre (37-42 semanas) de gravidez, respectivamente. Nenhum dos sujeitos seleccionados apresentava pré-eclâmpsia ou trabalho prematuro na actual gravidez. Foram recolhidas amostras de sangue materno com EDTA e fluido amniótico fetal dos casos do segundo trimestre como descrito previamente (Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998)). Para os casos do terceiro trimestre, as amostras de sangue materno com EDTA foram recolhidas 2 a 3 h antes da entrega vaginal normal. As amostras de sangue do cordão fetal com EDTA foram, também, recolhidas após entrega como descrito (Lo *et al.*, *Clin Chem* 46:1903-1906 (2000)). O plasma e a camada leucoplaquetária de todas as amostras de sangue seleccionadas foi recolhido e armazenado a -20 °C como descrito (Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998)), excepto as amostras de plasma que foram recentrifugadas a 16000 g. As amostras de fluido amniótico foram armazenadas a 4 °C.

Isolamento de ADN

O ADN foi extraído a partir das amostras de plasma e fluido amniótico utilizando o QIAamp Blood Kit (Qiagen). Foram utilizados habitualmente 800 µL de plasma ou fluido amniótico por coluna para a extracção de ADN. Foi utilizado um volume de eluição de 50-110 µL. O ADN foi extraído a partir da camada leucoplaquetária utilizando o Nucleon DNA Extraction Kit (Scotlabs) de acordo com as recomendações do fabricante.

Genotipagem da região polimórfica DMR

A DMR no locus IGF2-H19 humano contém duas unidades de repetição de 450 pb e sete de 400 pb. (Nakagawa *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:591-596 (2001)) (Fig. 2). Um SNP A/G dentro da DMR (Nakagawa *et al.*, *supra*) foi seleccionado como um marcador nesta investigação (Fig. 2). A reacção da polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada para amplificar o SNP em ambas as amostras de ADN maternas e fetais. Os iniciadores foram desenhados utilizando a sequência do gene *H19* de *Homo sapiens* (número de acesso do Genebank AF125183). Tipicamente, foram adicionados 2 a 5 µL de ADN eluído, purificado da camada leucoplaquetária materna, camada leucoplaquetária do cordão ou do fluido amniótico, a 25 µL de reacção de PCR contendo 2,5 µL de Tampão A TaqMan 10x (PE Applied Biosystems), MgCl₂ a 3 mM, 6,26 pmol de dNTPs, 5 pmol de iniciadores (sentido directo: 5'-ggACGGAATTGGTTGTAGTT-3'; sentido reverso: 5'-AGGCAATTGTCAGTTCAGTAA-3') e 0,625 U de polimerase de ADN AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems) (95 °C durante 8 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg). Para o iniciador em sentido directo,

os nucleótidos no exemplo anterior correspondem às posições 7927 a 7944 da sequência *H19* (número de acesso do Genbank AF125183). Para o iniciador no sentido reverso, os nucleótidos eram complementares às posições 8309 a 8329 da sequência *H19*. Os produtos de PCR foram então analisados por electroforese em gel de agarose e sequenciação de ADN.

Conversão por bissulfito

A modificação de bissulfito das amostras de ADN foi realizada utilizando um CpGenome DNA Modification Kit (Intergen) como indicado pelo fabricante. Com a conversão por bissulfito, os resíduos de citosina não metilados seriam convertidos a uracilo; enquanto que os resíduos de citosina metilados permaneceriam inalterados (Herman *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9821-9826 (1996)). A diferença da sequência entre ADN metilado e não metilado a seguir à conversão por bissulfito pode então ser distinguida utilizando iniciadores de PCR diferentes. Em geral, foi utilizado numa reacção de conversão por bissulfito, 1 µg de ADN da camada leucoplaquetária de sangue materno ou do cordão, ou 93 µL de ADN eluído purificado de plasma materno ou fluido amniótico. O ADN tratado com bissulfito foi então eluído em 25-50 µL de Tris-EDTA a 1 µM.

PCR específico de metilação (MSP)

Os ensaios de MSP foram modificados a partir do protocolo como descrito (Herman *et al.*, 1996). Foram adicionados cinco µL de ADN tratado com bissulfito a 50 µL de reacção de PCR contendo 5 µL de Tampão A TaqMan 10x (PE Applied Biosystems), MgCl₂ a

2,5 mM, 10 pmol de dNTPs, 20 pmol de cada um dos iniciadores de MSP correspondentes (Fig. 2) e 1,25 U de polimerase de ADN AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems). Os iniciadores M-for e M-rev (Fig. 2) foram desenhados para a sequência metilada, enquanto que os iniciadores U-for e U-rev (Fig. 2) foram desenhados para a sequência não metilada. As misturas da reacção foram sujeitas a ciclos térmicos (alelo metilado: 95 °C durante 45 seg, 55 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg; alelo não metilado: 95 °C durante 45 seg, 49 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg) durante 50 (ADN da camada leucoplaquetária e fluido amniótico) ou 56 ciclos (ADN de plasma), com um passo de desnaturação inicial de 8 min a 95 °C. Os produtos de PCR foram então analisados através de electroforese em gel de agarose. Os produtos da reacção foram purificados utilizando colunas Microspin S-300 HR (Amersham Pharmacia) para a sequenciação de ADN ou ensaio de extensão do iniciador.

Sequenciação de ADN

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando um *kit* da ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems) e os iniciadores em sentido directo correspondentes dos produtos de PCR. Os produtos de sequenciação foram analisados utilizando um ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

Ensaio de extensão do iniciador

Foram adicionados dois µL do produto de MSP purificado a 25 µL de reacção contendo ddATP a 50 µM

(2',3'-didesoxiadeninatrifosfato), dGTP a 50 μ M, dTTP a 50 μ M, 0,2 pmol de iniciador marcado com Cys-5 (5'-GGGTTATTTGGGAATAGGATATTTA-3'), 4 U de Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia) e 1,43 μ L de tampão concentrado. As reacções foram sujeitas a ciclos térmicos durante 40 ciclos (95 °C durante 30 seg, 51 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg). O iniciador marcado com Cys-5 possuía 25 nucleótidos (nt) de comprimento e o sítio polimórfico possuía 2 nt de distância do terminal 3' do iniciador. Para o alelo A, a incorporação do ddATP neste sítio polimórfico produziria terminação da cadeia, resultando assim num produto de extensão de 27 nt (*i. e.*, 25+2 nt). Para o alelo G, a extensão da cadeia continuaria até ao resíduo A seguinte que estava a 5 nt de distância do terminal 3' do iniciador, resultando assim num produto de extensão de 30 nt (*i. e.*, 25+5 nt). Os produtos da reacção foram sujeitos a electroforese utilizando um gel de poliacrilamida desnaturante a 14% e analisados utilizando um Sequenciador ALF Express (Amersham Pharmacia). Os dados foram analisados pelo programa AlleLinks (Amersham Pharmacia).

Resultados

Genotipagem de DMR

Foram seleccionadas trinta e nove mulheres grávidas neste estudo. O genótipo materno no SNP dentro da DMR (Fig. 2) foi determinado por sequenciação directa de produtos de PCR a partir do ADN da camada leucoplaquetária. O número de mulheres grávidas com cada um dos genótipos possíveis foram 17 (GG, 43,6%), 16 (AG, 41%) e 6 (AA, 15,4%).

Detecção de ADN fetal em plasma de mulheres heterozigóticas para um polimorfismo bialélico

As 16 mulheres que eram heterozigóticas (*i. e.*, AG) para o SNP foram seleccionadas para exames posteriores. Com base em critérios prévios, como isto é um polimorfismo bialélico estas mulheres não seriam consideradas informativas neste locus polimórfico para a detecção de ADN fetal em plasma materno, (Lo *et al.*, *Ann N Y Acad Sci* 731:204-213 (1994); Bianchi *Am J Hum Genet* 62:763-764 (1998)). Para demonstrar que a metilação diferencial nesta região genómica permitiria ultrapassar esta limitação, o ADN materno foi tratado com bissulfito e amplificado por MSP utilizando os iniciadores apresentados na Fig. 2. De um modo similar, o ADN fetal isolado a partir do fluido amniótico (amostras do segundo trimestre) ou camada leucoplaquetária do sangue do cordão (amostras do 3º trimestre) foi sujeito a PCR e MSP para determinar o estado de "imprinting" dos alelos fetais.

De entre os 16 exemplos seleccionados, os alelos metilados (*i. e.*, herdados paternalmente) das quatro amostras de fetos do 3º trimestre e de sete de 2º trimestre foram diferentes dos alelos metilados das respectivas mães (Fig. 3a,b; comparar painéis 1 e 2). Para testar se a metilação diferencial entre o feto e a mãe permitiria que o alelo fetal fosse detectado a partir do plasma materno, ADN de plasma materno a partir destes casos foi sujeito a conversão por bissulfito, seguido por MSP. De um modo interessante, o alelo fetal metilado herdado paternalmente poderia ser detectado em duas amostras de plasma materno do 3º trimestre e quatro do 2º trimestre (Fig. 3a,b; painéis 3). Para excluir a possibilidade que estas observações sejam simplesmente devidas à existência de ADN materno metilado

de modo aberrante no plasma materno, foi recolhido uma amostra de plasma materno pós-natal (~3,5 anos após entrega) de um dos casos positivos para exame posterior. Não foi observado o alelo metilado adicional nesta amostra pós-natal (Fig. 3a, painel 4), indicando que o alelo metilado adicional na amostra materna durante a gravidez foi de origem fetal. Adicionalmente, não foi observado sinal positivo no plasma de casos não informativos (n=4, dados não apresentados), demonstrando assim, posteriormente, a especificidade deste ensaio de MSP. Tomados em conjunto, estes dados indicam que a utilização de metilação diferencial entre a mãe e o feto permite detectar ADN fetal no plasma materno, mesmo em casos que não são considerados informativos com os critérios existentes.

Detecção de ADN de plasma materno derivado de feto herdado maternalmente

Foi então testado se a utilização de metilação diferencial entre mãe e feto poderia permitir detectar um alelo que o feto herdou da mãe. Este tipo de análise tinha sido julgado anteriormente ser impossível (Lo *et al.*, *Ann N Y Acad Sci* 731:204-213 (1994); Bianchi, *Am J Hum Genet* 62:763-764 (1998)). Uma vez que o alelo herdado maternalmente não foi metilado, os iniciadores U-for e U-rev (Fig. 2) foram utilizados para amplificar o alelo não metilado a seguir à conversão por bissulfito. De entre os 16 casos analisados, foram informativas três amostras maternas do 3º trimestre e cinco do 2º trimestre. Nestes casos, o feto possuía um alelo não metilado que era diferente do alelo não metilado da mãe. Estes resultados implicaram que nestes casos, a mãe possuía o alelo original do seu pai e depois passou-o para o feto. Destes 8 casos

informativos, apenas foi observado um sinal positivo fraco em uma das amostras do 3º trimestre através de sequenciação directa (Fig. 4a, comparação do painel 1 e painel 2).

Foi fundamentado que o sinal fraco neste único caso positivo e a baixa taxa de detecção do alelo fetal não metilado de plasma materno poderia ser devido à baixa sensibilidade do método de sequenciação directa. Para aumentar a sensibilidade da detecção, foi empregue um ensaio de extensão do iniciador com maior sensibilidade para detectar o alelo fetal não metilado a partir dos produtos de reacção de MSP. Como o SNP foi um polimorfismo A/G, foi utilizado ddATP como um substracto da reacção no ensaio de extensão do iniciador. Os produtos da reacção de extensão dos alelos A e G possuíam 27 e 30 nt de comprimento, respectivamente. Não esteve presente produto de reacção específico do feto nas amostras de camada leucoplaquetária maternas correspondentes (Fig. 4b, c; BC materna). De forma notória, foram observados produtos de extensão específicos em dois 3º^s trimestres (Fig. 4b, seta) e num 2º trimestre (Fig. 4c, seta) amostras de plasma materno, indicando a presença de ADN fetal não metilado no plasma materno. Como controlos, nenhum dos casos não informativos testados foi positivo neste ensaio (n=5, dados não apresentados). Estes resultados demonstraram, pela primeira vez, a viabilidade de utilizar marcadores epigenéticos para detectar uma sequência de ADN derivado de feto, herdada maternamente, de plasma materno.

Discussão

Estes resultados demonstram que a utilização de marcadores epigenéticos ultrapassa as limitações convencionais da detecção de ADN fetal em plasma materno. É possível detectar um alelo fetal herdado paternalmente, que é indistinguível geneticamente de um alelo materno, a partir de plasma da mãe, pela utilização de diferenças epigenéticas entre a mãe e o feto. Do mesmo modo, é possível detectar um alelo fetal herdado maternalmente a partir de plasma materno. Esta nova abordagem epigenética irá consequentemente expandir o reportório de distúrbios nos quais pode ser utilizado o ADN fetal de plasma materno.

Mesmo com a utilização de métodos relativamente insensíveis, tais como sequenciação directa e extensão do iniciador, os resultados presentes demonstram que é possível detectar diferencialmente sequências de ADN fetais metiladas de plasma materno. Existiu uma sensibilidade mais reduzida na detecção de ADN fetal não metilado no plasma materno (Fig. 4), quando comparado com o ensaio análogo para o alelo metilado (Fig. 3). Utilizando sistemas de detecção mais sensíveis, tais como PCR específico para alelos (Newton *et al.*, *Nucleic Acids Res* 17:2503-2516 (1989)) e PCR em tempo real específico para metilação (Lo *et al.*, *Cancer Res* 59:3899-3903 (1999); Eads *et al.*, *Nucleic Acids Res* 28:E32 (2000)), poderá aumentar a sensibilidade da análise epigenética baseada em plasma. O desenvolvimento de PCR em tempo real específico para metilação é particularmente interessante uma vez que cria a possibilidade de quantificar a metilação específica no feto no plasma materno, tal como já foi alcançado para a detecção de ADN tumoral em circulação (Kawakami *et al.*, *J Natl Cancer Inst* 92:1805-1811 (2000)).

A possível introdução de ADN fetal no plasma materno como uma ferramenta de diagnóstico pré-natal levantou questões no que se refere à necessidade de um marcador genérico para o ADN fetal circulante (Lo *et al.*, *Am J Hum Genet* 62:768-775 (1998); Avent *et al.*, *Vox Sang* 78:155-162 (2000)). A maioria das propostas para tal marcador focou-se até então na utilização de polimorfismos genéticos entre a mãe e o feto (Tang *et al.*, *Clin Chem* 45:2033-2035 (1999); Pertl *et al.*, *Hum Genet* 106:45-49 (2000)). A presente demonstração da viabilidade dos marcadores epigenéticos para a detecção de ADN fetal no plasma materno cria uma nova abordagem para o desenvolvimento de um marcador de feto independente do género e independente do polimorfismo no plasma materno. Um meio no qual isto pode ser alcançado é explorar o fenómeno da metilação específica de tecidos (Grunau *et al.*, *Hum Mol Genet* 9:2651-2663 (2000)). Uma vez que o trofoblasto foi sugerido ser a população de células predominante para libertar ADN fetal no plasma materno, a elucidação dos padrões de metilação específicos do trofoblasto permitem o desenvolvimento de um marcador fetal epigenético genérico no plasma materno. Biologicamente, a utilização de marcadores de metilação específicos para tecido pode também permitir abordar a questão de quais os tipos de células são responsáveis pela libertação de ADN fetal no plasma materno.

A análise epigenética do plasma materno possui aplicações óbvias para distúrbios associados com o "imprinting" genómico, tal como síndrome de Prader-Willi (Pfeifer, *Lancet* 356:1819-1820 (2000)). Esta estratégia pode também possuir potencial para diagnóstico de distúrbios, tal como pré-eclâmpsia, na qual foi colocada a hipótese dos genes "imprinted" desempenharem um papel (Graves, *Reprod Fertil Dev* 10:23-29 (1998)).

A possível aplicação de ADN fetal em plasma materno para a detecção pré-natal de aneuploidias cromossómicas fetais é uma questão que foi intensamente discutida desde a descoberta do fenómeno (Lo *et al.*, *Lancet* 350:485-487 (1997); Bianchi, *Am J Hum Genet* 62:763-764 (1998)). A verificação de diferenças quantitativas entre os níveis de ADN fetal circulante em gravidezes aneuplóides comparadas com gravidezes euplóides (Lo *et al.*, *Clin Chem* 45:1747-1751 (1999); Zhong *et al.*, *Prenat Diagn* 20:795-798 (2000)) oferece um método para estimar o risco de aneuploidias cromossómicas fetais a partir de plasma materno. A recente verificação de células fetais apoptóticas no plasma materno ("células derivadas do plasma") (Van Wijk *et al.*, *Clin Chem* 46:729-731 (2000)) oferece ainda outra abordagem para a detecção de aneuploidia de plasma materno (Poon *et al.*, *Lancet* 356:1819-1820 (2000)). De um modo interessante, os presente resultados criam ainda outra abordagem potencial para a detecção de aneuploidias cromossómicas fetais. Isto é baseado na observação de que padrões de metilação de ADN aberrantes podem estar associados com a aneuploidia cromossómica (Kuromitsu *et al.*, *Mol Cell Biol* 17:707-712 (1997); Yu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6862-6867 (1997)). Portanto, é possível desenvolver marcadores epigenéticos para detectar tais sequências de ADN fetais metiladas de um modo aberrante em plasma materno. Tais marcadores proporcionam especificidade comparada com uma quantificação simples de ADN fetal em plasma materno (Lo *et al.*, *Clin Chem* 45:1747-1751 (1999); Zhong *et al.*, *Prenat Diagn* 20:795-798 (2000)) e melhor adequabilidade para a aplicação em larga escala comparada com métodos baseados em células "derivadas de plasma" (Poon *et al.*, *Lancet* 356:1819-1820 (2000)).

Os marcadores epigenéticos fetais podem, também, ser utilizados na análise de células fetais isoladas a partir da fracção celular do sangue materno. Isto tira partido de resultados recentes mostrando que a análise da metilação pode ser realizada de um modo *in situ* (Nuovo *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12754-12759 (1999)).

Com a recente compreensão que o tráfico fetomaternal é um processo bidireccional (Lo *et al.*, *Blood* 88:4390-4395 (1996); Maloney *et al.*, *J Clin Invest* 104:41-47 (1999)), os marcadores epigenéticos podem também ser utilizados para investigar transferência celular e de ADN da mãe para o feto. Tal abordagem pode possuir também aplicações para a investigação de outros tipos de quimerismo, tais como quimerismo hemopoiético pós-transplante (Starzl *et al.*, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:292-298 (1997) e quimerismo de ADN da urina (Zhang *et al.*, *Clin Chem* 45:1741-1746 (1999)).

Com o entendimento acrescido do genoma humano e o desenvolvimento de tecnologias de base em sequências de elevada produtividade para a análise da metilação (Yan *et al.*, *Clin Cancer Res* 6:1432-1438 (2000)), é esperado que o número de marcadores epigenéticos fetais utilizáveis aumentará rapidamente ao longo dos próximos anos seguintes. Tal desenvolvimento proporcionará um painel clinicamente relevante de marcadores epigenéticos fetais que pode ser utilizado num modo sinérgico com marcadores genéticos convencionais em plasma materno.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> The Chinese University of Hong Kong
Lo, Yuk Ming Dennis
Poon, Lit Man

<120> Métodos para Detectar ADN Proveniente De Individuos
Diferentes

<130> CMD/FP6090815

<140> PCT/GB02/03941

<141> 2002-08-30

<150> US 09/944,951

<151> 2001-08-31

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador M-for de PCR específico para metilação (MSP) da sequência metilada do gene do receptor do androgénio

<400> 1

gcgagcgtag tatttttcgg c

21

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador M-rev de PCR específico para metilação (MSP) da sequência metilada do gene do receptor do androgénio

<400> 2

aaccaaataa cctataaaac ctctacg

27

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador U-For de PCR específico para metilação (MSP) da sequência não-metilada do gene do receptor de androgénio

<400> 3

gttgtgagtg tagtattttt tggt

24

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador U-rev de PCR específico para metilação (MSP) da sequência não-metilada do gene do receptor de androgénio

<400> 4

caaataacct ataaaacctc taca

24

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador no sentido directo para amplificação por PCR de polimorfismo num único nucleótido (SNP) dentro da região diferencialmente metilada (DMR) da região IGF2-H19 humana

<400> 5

ggacggaatt ggttgtagtt

20

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador no sentido reverso para amplificação por PCR de polimorfismo num único nucleótido (SNP) dentro da região diferencialmente metilada (DMR) da região IGF2-H19 humana

<400> 6

aggcaattgt cagttcagta a

21

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador M-for no sentido reverso para PCR específico para metilação (MSP) para o sítio do polimorfismo num único nucleótido (SNP) dentro da região diferencialmente metilada (DMR) da região do alelo metilado IGF2-H19 humano

<400> 7

ttaattgggg ttcgttcg

18

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador M-rev no sentido reverso para PCR específico para metilação (MSP) para o sítio de polimorfismo num único nucleótido (SNP) dentro da região diferencialmente metilada (DMR) da região do alelo metilado IGF2-H19 humano

<400> 8

cccgacctaa aatcttaata cga

23

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador U-for no sentido directo para PCR específico para metilação (MSP) para o sítio de polimorfismo num único nucleótido (SNP) dentro da região diferencialmente metilada (DMR) da região do alelo não metilado IGF2-H19 humano

<400> 9

ggtttggttg tggaaatggt tt

22

<210> 10

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador U-rev no sentido reverso para PCR específico para metilação (MSP) para o sítio de polimorfismo num único nucleótido (SNP) dentro da região diferencialmente metilada (DMR) da região do alelo não metilado IGF2-H19 humano

<400> 10

cccaacctaa aaatctaata caa

23

<210> 11

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador marcado com Cys-5 do ensaio de extensão do iniciador

<400> 11

gggttatattg ggaataggat attta

25

Lisboa, 15 de Março de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Método para diferenciar espécies de ADN provenientes de células de indivíduos diferentes, em que as espécies de ADN estão presentes numa amostra biológica obtida a partir de um dos indivíduos, compreendendo o método o passo para detectar uma diferença na metilação entre as espécies de ADN dos diferentes indivíduos.
2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a amostra biológica é uma amostra de fluido ou de células ou uma sua mistura.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a amostra biológica é plasma ou soro.
4. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a amostra biológica é sangue.
5. Método de acordo com a reivindicação 1 em que um dos indivíduos é uma fêmea grávida e o outro indivíduo é um feto não nascido.
6. Método de acordo com a reivindicação 1 em que um dos indivíduos é um receptor de transplante e o outro indivíduo é um dador de órgão.
7. Método de acordo com a reivindicação 6 em que o transplante é um transplante de medula óssea.

8. Método de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda o passo de medição da concentração de espécies de ADN.
9. Método de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda o passo de adição de bissulfito de sódio à amostra biológica ou às espécies de ADN.
10. Método de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda o passo de realização de uma reacção de polimerase em cadeia específica para metilação.
11. Método de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda os passos de amplificação das espécies de ADN para gerar um produto de PCR e sequenciar o produto de PCR.
12. Método de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda o passo de realização de extensão do iniciador.
13. Método de acordo com a reivindicação 5 em que a amostra biológica é plasma materno ou soro.
14. Método de acordo com a reivindicação 13 compreendendo ainda o passo de medição da concentração de ADN fetal em plasma materno ou soro.
15. Método de acordo com a reivindicação 14 em que a concentração de ADN fetal medida é utilizada para prever, monitorizar, diagnosticar ou prognosticar um distúrbio.

16. Método de acordo com a reivindicação 5 em que a diferença na metilação está associada com um distúrbio no feto ou materno.
17. Método de acordo com a reivindicação 16 em que o distúrbio é uma aneuploidia cromossomal.
18. Método de acordo com a reivindicação 17 em que a aneuploidia cromossomal é trissomia 21 (síndrome de Down).
19. Método de acordo com a reivindicação 16 em que o distúrbio é seleccionado do grupo de pré-eclâmpsia, distúrbio de "imprinting", síndrome de Prader-Willi e síndrome de Angelman.
20. Método de acordo com a reivindicação 14 em que a diferença na metilação detectada nas células fetais é utilizada como um marcador específico de feto.
21. Método de acordo com a reivindicação 6 compreendendo ainda o passo de medição da concentração de ADN do dador de órgão e do receptor do transplante.
22. Método de acordo com a reivindicação 21 em que a concentração de ADN no dador do órgão e no receptor do transplante é utilizada para prever o progresso clínico do receptor do transplante.
23. Método de acordo com a reivindicação 1 em que um dos indivíduos é masculino e o outro indivíduo é feminino.

24. Método de acordo com a reivindicação 23 em que a diferença da metilação é detectada num cromossoma X inactivado do indivíduo feminino.
25. Método de acordo com a reivindicação 24 em que a sequência de ADN metilado no cromossoma X inactivado é utilizada para detectar ADN proveniente do indivíduo feminino.
26. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a diferença de metilação é analisada dentro das células.
27. Método de acordo com a reivindicação 26 em que a diferença da metilação é analisada utilizando reacção de polimerase em cadeia específica para metilação *in situ*.
28. Método de acordo com a reivindicação 1 em que a diferença da metilação é utilizada para seleccionar ou isolar células dos indivíduos ou utilizada para purificar ADN dos indivíduos.
29. Método de acordo com a reivindicação 5 em que a diferença na metilação é detectada nas células fetais na placenta.
30. Utilização de um *kit* para diferenciar espécies de ADN provenientes de células de indivíduos diferentes, em que as espécies de ADN estão presentes numa amostra biológica obtida a partir de um dos indivíduos, compreendendo o *kit* um ou mais reagentes para determinar o estado da metilação de uma espécie de ADN.

31. Utilização de acordo com a reivindicação 30 em que o reagente para determinar o estado da metilação é bissulfito de sódio.
32. Utilização de acordo com a reivindicação 30 compreendendo ainda um ou mais reagentes para detectar a presença de ADN.
33. Utilização de acordo com a reivindicação 30 compreendendo ainda um ou mais reagentes para amplificar ADN presente na amostra biológica.
34. Utilização de acordo com a reivindicação 30 compreendendo ainda um ou mais mecanismos para obter uma amostra de ADN.

Lisboa, 15 de Março de 2007

Fig.1A.

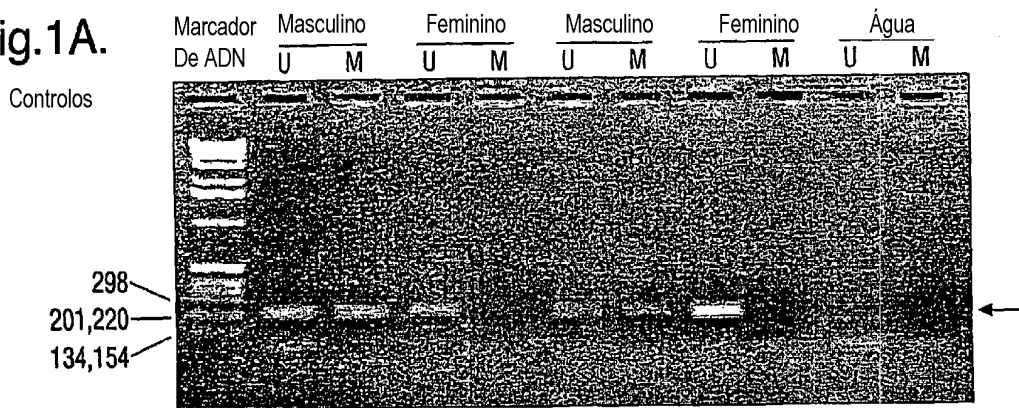


Fig.1B.

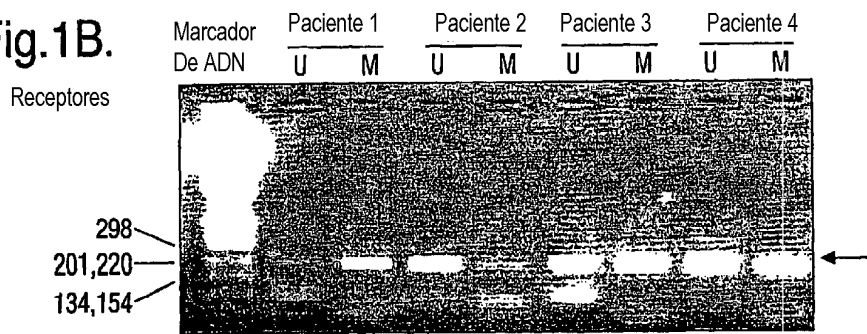
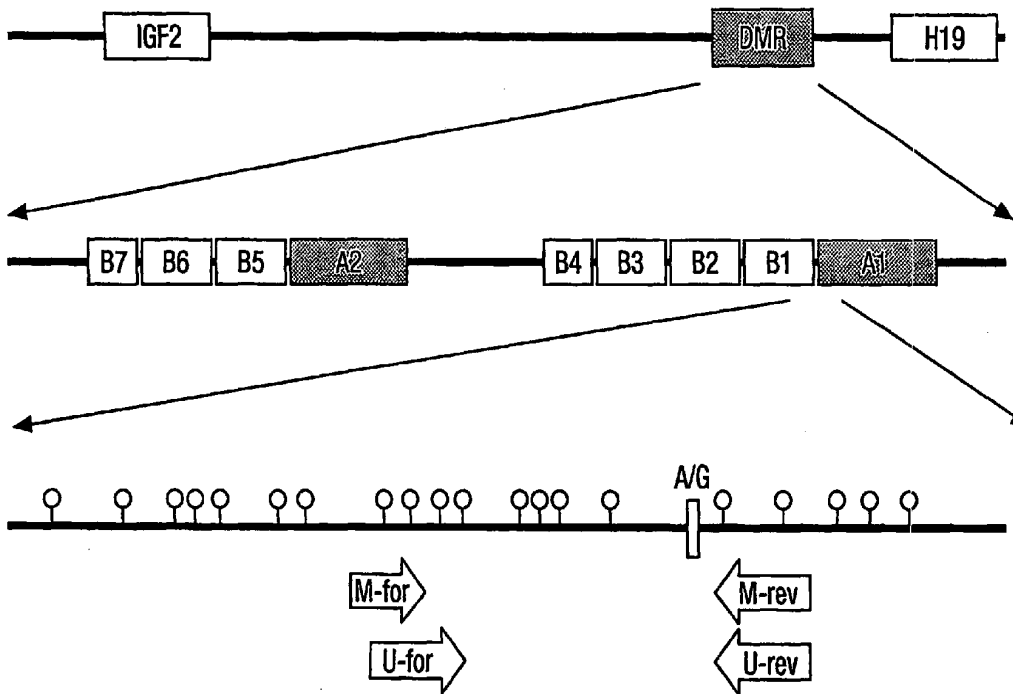


Fig.2.



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

Fig.3A.

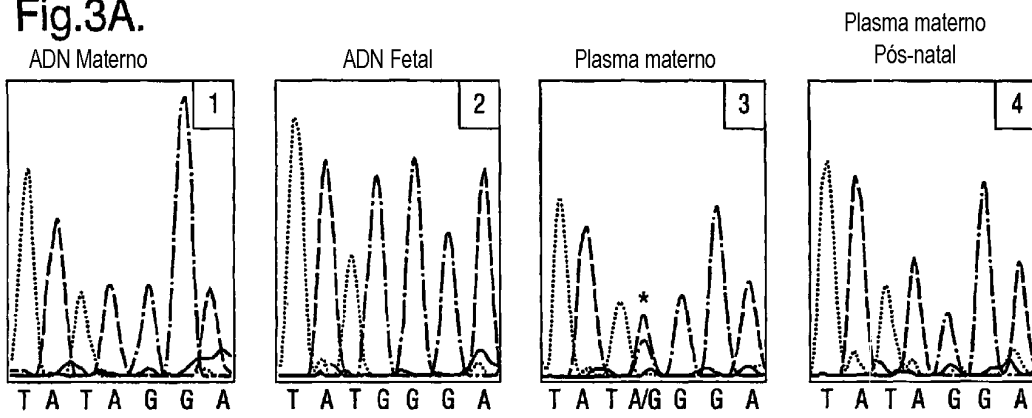


Fig.3B.

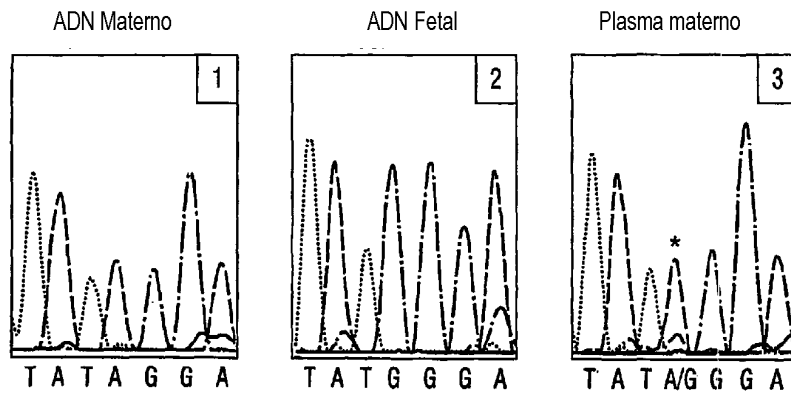


Fig.4A.

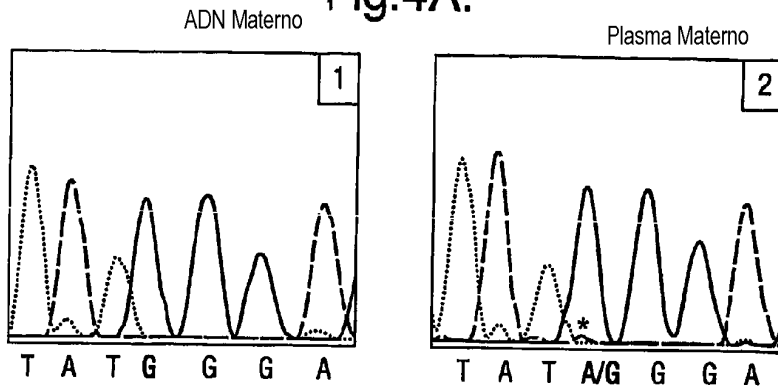


Fig.4b.

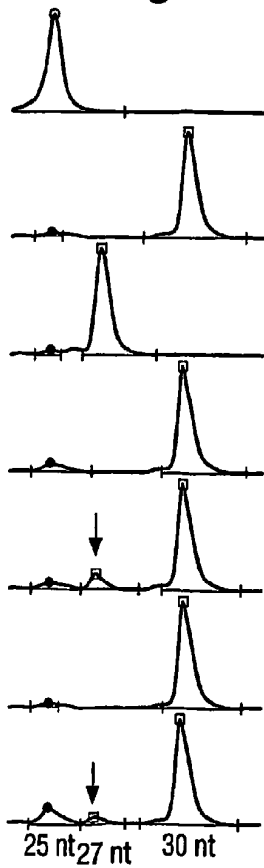


Fig.4c.

