

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193200 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.17

(51) Int. Cl. G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.08

(54) ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ FACS

(31) 19179087.2

(32) 2019.06.07

(33) EP

(86) PCT/EP2020/065832

(87) WO 2020/245459 2020.12.10

(71) Заявитель:
АРСЕДИ БАЙОТЕК АПС (DK)

(72) Изобретатель:

Николаисен Болетта Хестбек,
Кёльвро Дэвид Матиас Мартин
Лейдинг, Кристенсен Инга Боск, Раун
Катарина, Йенпесен Лина Даль, Хатт
Лотта, Йенсен Палле Скельда, Сингх
Рипудаман (DK)

(74) Представитель:

Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к автоматизированным способам выделения фетальных клеток из образца, такого как образец крови, полученный от беременной женщины. Выделенные клетки плода можно использовать для выявления генетических аномалий в ДНК плода.

A1

202193200

202193200

A1

ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ FACS

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к автоматизированным способам выделения фетальных клеток из образца, такого как образец крови, полученного от беременной женщины. Выделенные фетальные клетки могут быть использованы для выявления генетических патологий в ДНК плода.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Во время беременности фетальные клетки из плаценты могут проникать в кровообращение матери. Большинство этих фетальных клеток происходят из плаценты и являются трофобластами, эндоваскулярными трофобластами или вневорсинчатыми трофобластами (EVT). Эти фетальные клетки, проникающие в кровообращение матери, обладают как эндотелиальными, так и эпителиальными свойствами. Процесс, в ходе которого эпителиальные трофобласты претерпевают изменения в своих свойствах и проникают в кровообращение матери, называется эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП).

ЭМП – это процесс, в ходе которого эпителиальные клетки постепенно теряют свои эпителиальные свойства и приобретают мезенхимальный фенотип. Протекание ЭМП было описано на ранних этапах эмбриогенеза, когда миграция и временная дедифференцировка эмбриональных эпителиальных клеток необходимы для образования, например, нервной трубки.

При использовании маркера мезодермы (т. е. эндотелиального маркера) в качестве маркера положительного отбора фетальные клетки, присутствующие в образце материнской крови в очень малом количестве, обогащаются вместе с некоторыми материнскими клетками. Затем проводят положительную идентификацию фетальных клеток путем приведения обогащенных клеток в контакт с эпителиальным маркером, используя, таким образом, явление ЭМП. Ни один вид нормальных материнских клеток, присутствующих в образце крови, не экспрессирует какие-либо эпителиальные маркеры.

В способах уровня техники, проиллюстрированных на фиг. 2А, образцы материнской крови подвергали обработке с последующим обогащением путем удаления большинства материнских клеток. Затем клетки окрашивали флуоресцентно мечеными материнскими и фетальными маркерами и сканировали на предметном стекле. Последний процесс является трудоемким и времязатратным, учитывая чрезвычайно низкое содержание фетальных клеток в образце материнской крови.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте изобретение относится к способу выделения фетальных клеток из биологического образца беременной женщины, включающему стадии:

а. обеспечения биологического образца от указанной беременной женщины, содержащего клеточную фракцию,

б. приведения клеток, содержащихся в указанной клеточной фракции, в контакт с одним или более агентами для флуоресцентного мечения, специфичными к по меньшей мере одному эпителиальному маркеру и/или эндотелиальному маркеру фетальных клеток,

в. сортировки указанных клеток способом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), основанным на обнаружении указанных одного или более агентов для флуоресцентного мечения, связанных с клетками, и

г. идентификации фетальных клеток среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что с помощью FACS можно провести сортировку одиночных клеток и затем идентифицировать клетки, с высокой вероятностью являющиеся фетальными, просто проанализировав выходные данные FACS в отношении ряда параметров, таких как светорассеяние и сигналы от одного или более флуоресцентно меченых антител. Выходные данные могут быть объединены в классификацию, которая может быть балльной или бинарной. Используя способы согласно изобретению, авторы разработали способ, позволяющий с очень высокой вероятностью идентифицировать фетальные клетки среди отсортированных клеток.

Преимущества в сравнении с существующим уровнем техники проиллюстрированы на фиг. 1, и главное преимущество состоит в том, что данный процесс может быть полностью автоматизирован и не требует сбора клеток, идентифицированных как вероятные фетальные клетки.

Идентифицированные клетки могут быть верифицированы как фетальные клетки с помощью генетического анализа, и затем могут быть использованы для выявления генетических патологий в клетках.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу определения генетической патологии у плода, включающему стадии:

а. получения одной или более фетальных клеток, выделенных способом согласно изобретению, и

b. обнаружения одного или более генетических маркеров, связанных с указанной генетической патологией, в геноме указанной фетальной клетки.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

5 Фиг. 1

Обоснование применения FACS для обогащения и выделения фетальных клеток.

А) Отбор фетальных клеток после этой стадии трудоемок и снижает производительность процесса. В) Отбор фетальных клеток после этой стадии происходит быстрее и с меньшим риском загрязнения материнскими клетками. Однако по-прежнему требуется участие
10 оператора. С) Не требуется физический сбор фетальных клеток. 1 клетка на 96-луночный планшет с последующим анализом одиночных клеток.

Фиг. 2

Обогащение фетальных клеток без FACS (А) и с FACS (В)
15 А.1 и В.1 – взятие образцов, А.2 и В.2 – обработка крови, А.3 и В.3 – отбор, обогащение и окрашивание, А.4 и В.5 – сканирование и сбор фетальных клеток, и В.4 – FACS.

Фиг. 3

Координаты X и Y гейта 1 на графике FACS для Alexa Fluor 488 (ось X) (антитела к
20 СК) и PE (ось Y) (CD14 + CD45). Две из пяти координат, которые соединяет диагональная линия, не фиксированы, а имеют диапазон по осям x и y.

Фиг. 4

Сортировка одиночных клеток с помощью FACS и их анализ с помощью STR-
25 анализа (анализ коротких tandemных повторов). А) – взятие образцов, В) – обработка крови, С – отбор, обогащение и окрашивание, D) – FACS и E) – ABI 3500 (STR-анализ)

Фиг. 5

Координаты X и Y гейта G7 на графике FACS для Alexa Fluor 488 (ось X) (антитела
30 к СК) и PE (ось Y) (CD14 + CD45). Гейт G7 использовали для индивидуальной сортировки одиночных клеток в отдельные пробирки.

Фиг. 6

Объединенные данные из STR-анализа одиночных отсортированных клеток.
35 Процентные значения на фигуре представляют собой среднее индивидуальных

процентных значений из каждого образца. А) – материнские клетки, В) – фетальные клетки, С) – фетальные + материнские клетки, D) – пустые и Е) – другие загрязнения

Фиг. 7

5 Технологический процесс полностью реализованного изобретения, с обогащением, идентификацией и анализом фетальных клеток после сортировки одиночных клеток с помощью FACS. А) – взятие образцов, В) – обработка крови, С – отбор, обогащение и окрашивание, D) – FACS, Е) = полногеномная амплификация (WGA), F) – ABI 3500 (STR-анализ) и G) – сравнительная геномная гибридизация на чипах.

10

Фиг. 8

Стратегия гейтирования. А) Все события, FSC-A (прямое светорассеяние) (ось X) и SSC-A (ось Y). События (детрит) с высокими значениями SSC (боковое светорассеяние) были исключены. В) События с низким SSC, FSC-A (ось X) и Hoechst (ось Y). Затем оставшиеся клетки гейтировали по клеткам Hoechst⁺. С) События Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Из фракции Hoechst⁺ выделяли клетки CK⁺CD45⁺CD14⁺ сортировкой одиночных клеток.

15

Фиг. 9

20 Стратегия гейтирования для первой сортировки. А) Все события, FSC-A (ось X) и SSC-A (ось Y). События (детрит) с высокими значениями SSC были исключены. В) События с низким SSC, FSC-A (ось X) и Hoechst (ось Y). Затем оставшиеся клетки гейтировали по клеткам Hoechst⁺. С) События Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Из фракции Hoechst⁺ массово отсортировывали клетки CK^{medium-to-high} CD45⁺CD14⁺ в качестве

25 стадии обогащения.

25

Фиг. 10

Стратегия гейтирования для второй сортировки. А) Все события, FSC-A (ось X) и SSC-A (ось Y). События (детрит) с высокими значениями SSC были исключены. В) События с низким SSC, FSC-A (ось X) и Hoechst (ось Y). Затем оставшиеся клетки гейтировали по клеткам Hoechst⁺. С) События Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Из фракции Hoechst⁺ выделяли клетки CK^{high}CD45⁺CD14⁺ сортировкой одиночных клеток.

30

Фиг. 11

Стратегия гейтирования для первой сортировки для образца 3091-B. А) Все события, FSC-A (ось X) и SSC-A (ось Y). События (детрит) с высокими значениями SSC были исключены. В) События с низким SSC, FSC-A (ось X) и Hoechst (ось Y). Затем оставшиеся клетки гейтировали по клеткам Hoechst⁺. С) События Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Из фракции Hoechst⁺ массово отсортировывали клетки CD141+CD105^{medium-to-high}CD45⁻CD14⁻ в качестве стадии обогащения.

Фиг. 12

Стратегия гейтирования для второй сортировки для образца 3091-B. А) Все события, FSC-A (ось X) и SSC-A (ось Y). События (детрит) с высокими значениями SSC были исключены. В) События с низким SSC, FSC-A (ось X) и Hoechst (ось Y). Затем оставшиеся клетки гейтировали по клеткам Hoechst⁺. С) События Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Из фракции Hoechst⁺ выделяли клетки CD141+CD105^{high}CD45⁻CD14⁻ сортировкой одиночных клеток.

Фиг. 13

Стратегия гейтирования для второй сортировки А) События с низким SSC, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Вторая сортировка для образца AAL302-B. Не добавляли Hoechst, CD45 или CD14. В) События с низким SSC и Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Вторая сортировка для образца AAL302-A. Добавляли Hoechst, но не добавляли CD45 или CD14.

Фиг. 14

Стратегия гейтирования для второй сортировки А) События с низким SSC и Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Вторая сортировка для образца КО381, где не добавляли CD45. В) События с низким SSC и Hoechst, AF488 (ось X) и AF555 (ось Y). Вторая сортировка для образца КО380, где не добавляли CD14.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Трудности, связанные с выделением фетальных клеток из образца материнской крови, проиллюстрированы на фиг. 1. Как правило, образец крови объемом 30 мл после лизиса эритроцитов содержит приблизительно 150 миллионов клеток. Образец может быть обогащен фетальными клетками с использованием описанных в настоящем документе способов обогащения. Таким образом можно получить образец с приблизительно 250000 клеток. Фетальных клеток среди них очень мало, поэтому ручной

скрининг на фетальные клетки или сбор клеток с предметного стекла является очень трудоемким способом.

Один из примеров такого способа проиллюстрирован на блок-схеме на фиг. 2А, где берут образец крови, обрабатывают его и подвергают обогащению. Оставшиеся клетки наносят на предметное стекло, сканируют и собирают под микроскопом с использованием комбинации ручных и полуавтоматических процедур.

Один из примеров, приведенных авторами настоящего изобретения, демонстрирует, что сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS) может быть использована для дополнительного обогащения этой популяции фетальными клетками, чтобы снизить количество клеток, которые все же потребуется оценить по отдельности, до нескольких тысяч клеток. Блок-схема, иллюстрирующая этот способ, представлена на фиг. 2В.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что из обогащенного образца материнской крови возможно отсортировать одиночные фетальные клетки, поэтому изобретение также относится к способу пренатальной диагностики, включающему стадии:

1. обеспечения образца крови женщины, вынашивающей плод, содержащего клеточную фракцию,
2. обогащения указанного образца фетальными клетками,
3. приведения указанного образца в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения, выбранным из каждой из следующих групп:

- i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,
- ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
- iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных клеток,

4. сортировки одиночных клеток для получения по меньшей мере одной фетальной клетки из указанного обогащенного образца с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS) на основании:

- i. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру фетальных клеток,
- ii. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к ядру, и
- iii. отрицательного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру материнских клеток,

5. идентификации указанного по меньшей мере одного фетального трофобласта среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения путем получения генотипа из указанного фетального трофобласта, и

6. диагностики фенотипа указанного плода.

Целью обогащения с помощью MACS является снижение количества клеток, загружаемых в прибор FACS (см. фиг. 1, где показано, что обогащение снижает количество клеток с приблизительно 150 млн до приблизительно 250000). Проведение обогащения с помощью MACS не является обязательным, как показано в примерах, демонстрирующих, что возможна идентификация фетальных клеток из необогащенного образца. MACS просто приводит к гораздо большему количеству событий в приборе FACS. Более конкретно, пример 3 демонстрирует, что FACS может быть использована для обогащения образца фетальными клетками.

Магнитно-активированная сортировка клеток (MACS) – это способ разделения различных популяций клеток в зависимости от их поверхностных антигенов (молекул CD).

В других вариантах осуществления MACS используют в отношении внутриклеточной мишени, например, с микрогранулами, специфичными к эпителиальным маркерам, такими как микрогранулы к цитокератину.

В системе MACS от Miltenyi Biotec используются суперпарамагнитные наночастицы и колонки. Суперпарамагнитные наночастицы имеют размер порядка 100 нм. Они используются для мечения целевых клеток, чтобы захватить их внутри колонки. Колонку помещают между постоянными магнитами, чтобы при прохождении через нее комплекса магнитная частица-клетка меченые клетки могли быть захвачены. Колонка состоит из стальной ваты, которая увеличивает градиент магнитного поля для максимальной эффективности разделения при помещении колонки между постоянными магнитами.

Магнитно-активированная сортировка клеток представляет собой широко используемый способ, часто в сочетании с микрогранулами, которые представляют собой магнитные наночастицы, конъюгированные с антителами, которые могут быть использованы для нацеливания на определенные клетки. Магнитно-активированная сортировка клеток может быть использована для обогащения популяции клеток желаемыми клетками. Магнитные наночастицы могут быть непосредственно конъюгированы с агентом для мечения. Магнитные наночастицы также могут быть

конъюгированы с другим агентом, способным связывать агент для мечения (вторичное мечение).

Если MACS выбрана в качестве стадии обогащения, предпочтительно, чтобы этой стадии предшествовала стадия приведения клеток, содержащихся в клеточной фракции, в
5 контакт с по меньшей мере одним меченым агентом для магнитного мечения, специфичным к маркеру фетальных клеток.

В одном из вариантов осуществления изобретения образец обогащают фетальными клетками путем отбора клеток, меченых агентом для мечения, специфичным к одному или более эндотелиальным маркерам. Примеры эндотелиальных маркеров описаны ниже в
10 настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления изобретения образец обогащают фетальными клетками путем отбора клеток, меченых агентом для мечения, специфичным к одному или более эпителиальным маркерам. Примеры эпителиального маркера описаны ниже в настоящем документе.

15 Эпителиальный маркер(ы) может быть использован для обогащения образца фетальными клетками. Обогащение может быть выполнено с помощью иммобилизации антител на твердой поверхности.

Сортировка клеток – это способ, используемый для очистки популяций клеток на основании наличия или отсутствия определенных физических характеристик. В
20 проточных цитометрах с возможностью сортировки прибор обнаруживает клетки, используя такие параметры, как размер клеток, морфология и экспрессия белка, а затем капельную технологию для сортировки клеток и выделения субпопуляций для использования после эксперимента.

Сортировщики клеток для проточной цитометрии имеют систему сбора, в отличие
25 от анализаторов для проточной цитометрии. Процесс сбора начинается при введении образца в поток проточной жидкости, который проходит через проточную кювету и сканирующий лазер. Затем поток переносит клетку через вибрирующее сопло. Возмущение потока заставляет его разбиваться на каплю, в идеале содержащую одну клетку. Кольцо с электрическим зарядом размещено именно в том месте, где поток разбивается на капли. Заряд подается на кольцо непосредственно перед измерением
30 интенсивности флуоресценции, а противоположный заряд улавливается каплей, когда она отрывается от потока. Затем заряженные капли падают через систему электростатического отклонения, которая направляет капли в контейнеры в зависимости от их заряда. В некоторых системах заряд прикладывается непосредственно к потоку, и при отрыве капля

сохраняет заряд того же знака, что и у потока. Затем поток возвращается в нейтральное состояние после отрыва капли.

При сборе в стерильных условиях отсортированные клетки могут быть дополнительно культивированы, подвергнуты манипуляциям и изучены.

5 Сортировка на таком приборе FACS может представлять собой как сортировку одиночных клеток, так и массовую сортировку, клетки, которые отбрасываются и не демонстрируют заданные пороговые значения, являются...

10 Гейты устанавливаются для определения того, как прибор FACS должен сортировать клетки. Клетки, попадающие в пределы заданных параметров, сортируются, а клетки, выходящие за пределы гейтов, либо сортируются для последующих исследований, либо отбрасываются. В зависимости от того, как прибор FACS настроен пользователем, сортировка может представлять собой либо массовую сортировку, либо сортировку одиночных клеток. При массовой сортировке клетки, попадающие в пределы заданных параметров гейтирования, собираются в одной и той же пробирке. При сортировке
15 одиночных клеток клетки, попадающие в пределы заданных параметров, индивидуально сортируются в пробирки для сбора. Сортировка одиночных клеток часто занимает больше времени, чем массовая сортировка, как проиллюстрировано в примере 5. Поскольку прибор FACS может сортировать несколько тысяч клеток в секунду, разные настройки в зависимости от эксперимента могут значительно различаться. При
20 сортировке в резервуары для одиночных клеток выход является низким, например в резервуары 96-луночного планшета. Напротив, при помощи массовой сортировки можно отсортировать несколько тысяч клеток на пробирку.

В одном из вариантов осуществления изобретения массовую сортировку используют для обогащения образца. В еще одном варианте осуществления сортировку
25 одиночных клеток используют для сортировки клеток на одиночные клетки, например, в резервуары для одиночных клеток.

В зависимости от стратегии гейтирования, используемой в эксперименте, можно уменьшить количество агентов, которые необходимо применить к образцу, а также время, затрачиваемое на эксперимент, применяя сначала массовую сортировку, а затем
30 сортировку одиночных клеток. Такие параметры в соответствующих случаях могут включать количественную оценку прямого светорассеяния, бокового светорассеяния и флуоресценции, испускаемой флуорофорами, возбуждаемыми лазерами в проточном цитометре.

Под прямым светорассеянием понимается изменение направления светового
35 потока, вызываемое объектом, и оно обычно коррелирует с размером клетки.

Под боковым светорассеянием понимается свет, отраженный от направления светового потока, и оно обычно коррелирует с количеством гранул на пути светового потока.

Количественное определение испускаемой флуоресценции осуществляется, когда источник света, такой как лазер, возбуждает флуорофоры, присутствующие на образце, и проходит через фильтры, известные специалисту в данной области техники, как подходящие для использования с данными лазерами и флуорофорами. Имея флуорофор с определенной длиной волны возбуждения и длиной волны испускания, специалист в данной области техники может выбрать источник света с подходящей длиной волны и подходящие фильтры возбуждения и испускания.

После измерения параметров проточным цитометром клетки могут быть отсортированы. В соответствующих случаях это осуществляют путем сортировки каждой клетки в отдельный резервуар. Отсортированные клетки предпочтительно представляют собой клетки, экспрессирующие по меньшей мере один эпителиальный маркер и/или эндотелиальный маркер, и не экспрессирующие по меньшей мере один клеточный маркер, специфичный для клеток крови. Примеры того, как осуществляется выбор клеток для сортировки, можно найти в разделе примеров, где для сортировки выбраны определенные гейты. Гейт выбирают таким образом, чтобы максимизировать вероятность сортировки фетальных клеток, поддерживая при этом относительно низким количество отсортированных клеток. Оставшиеся – неотсортированные – клетки отбрасывают, поскольку не ожидается, что они будут содержать какие-либо фетальные клетки.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления FACS используют для обогащения, при котором предпочтительно отсортированные клетки собирают в пробирку до проведения сортировки одиночных клеток с помощью FACS обогащенного таким образом образца.

В одном из вариантов осуществления образец обогащают с помощью FACS на основании сигнала от эпителиального маркера.

В еще одном варианте осуществления образец обогащают с помощью FACS на основании сигнала от эндотелиального маркера.

Таким образом, если FACS выбрана в качестве стадии обогащения, предпочтительно, чтобы этой стадии предшествовала стадия приведения клеток, содержащихся в клеточной фракции, в контакт с по меньшей мере одним флуоресцентно меченым агентом, специфичным к маркеру фетальных клеток.

После стадии обогащения проводят сортировку одиночных клеток с помощью FACS. В предпочтительном варианте осуществления клетки, положительные на по

меньшей мере один эпителиальный маркер и отрицательные на или имеющие низкий уровень указанного по меньшей мере одного маркера клеток крови, сортируют в резервуары для одиночных клеток. Это проиллюстрировано на фиг. 8, С).

5 В еще одном предпочтительном варианте осуществления клетки сортируют в резервуары для одиночных клеток на основании положительного сигнала для фетального маркера, маркера ядра, и отрицательного сигнала для материнского маркера. Это проиллюстрировано на фиг. 8, В) и С).

10 В предпочтительном варианте осуществления образец сортируют с использованием одной и той же стратегии гейтирования для обогащения и сортировки одиночных клеток.

В еще одном варианте осуществления образец сортируют с использованием одной и той же стратегии гейтирования для обогащения и сортировки одиночных клеток, за исключением того, что гейт для обогащения и сортировки одиночных клеток различается по размеру.

15 В раскрытых в настоящем документе способах выделения предпочтительно используются агенты для флуоресцентного мечения для селективного мечения фетальных и материнских клеток. В одном из вариантов осуществления в указанных способах используются эндотелиальные, эпителиальные маркеры и маркеры клеток крови, чтобы отличить фетальные клетки от материнских клеток, и может дополнительно
20 использоваться ядерный краситель, чтобы отличить клетки от детрита.

В других вариантах осуществления агенты для мечения представляют собой агенты для магнитного мечения, которые могут быть иммобилизованы в способах, используемых в изобретении, таких как MACS.

Фетальный маркер может представлять собой один или более эпителиальных
25 маркеров, например, один или более цитокератинов (СК). Цитокератины представляют собой белки кератины, содержащиеся во внутрицитоплазматическом цитоскелете эпителиальной ткани. Размер цитокератинов варьирует от 40 до 68 кДа. Они являются важным компонентом промежуточных филаментов, которые помогают клеткам
30 противостоять механическим воздействиям. Экспрессия этих цитокератинов в эпителиальных клетках в значительной степени специфична для конкретных органов или тканей. Цитокератины выбраны из группы, состоящей из человеческого цитокератина 1 СК1, человеческого цитокератина 2 СК2, человеческого цитокератина 3 СК3, человеческого цитокератина 4 СК4, человеческого цитокератина 5 СК5, человеческого цитокератина 6 СК6, человеческого цитокератина 7 СК7, человеческого цитокератина 8
35 СК8, человеческого цитокератина 9 СК9, человеческого цитокератина 10 СК10,

человеческого цитокератина 13 СК13, человеческого цитокератина 14 СК14, человеческого цитокератина 15 СК15, человеческого цитокератина 16 СК16, человеческого цитокератина 17 СК17, человеческого цитокератина 18 СК18, человеческого цитокератина 19 СК19.

5 В предпочтительных вариантах осуществления цитокератин представляет собой СК7, СК8, СК18, СК19 или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления агент для мечения, специфичный к эпителиальным маркерам, представляет собой агент для мечения к пан-СК. Агент для мечения к пан-СК представляет собой агент для мечения, нацеленный на несколько цитокератинов одновременно. В одном из вариантов осуществления агент для мечения к пан-СК нацелен на цитокератины с молекулярной массой 58, 56, 52, 60, 51, 48 и 68 кДа.

В предпочтительных вариантах осуществления агенты для мечения представляют собой комбинацию агентов, нацеленных на СК7, СК8, СК18, СК19, а также агента для мечения к пан-СК.

15 Различать разные цитокератиновые маркеры нет необходимости, поэтому в соответствующих случаях агенты для флуоресцентного мечения, нацеленные на разные цитокератины, могут иметь один и тот же флуорофор.

Эндотелиальные маркеры могут быть использованы для обогащения, как описано выше, но также могут быть использованы для флуоресцентного мечения, и зарегистрированная флуоресценция может быть использована для классификации.

Дополнительным параметром может быть флуоресценция одного или более флуоресцентно меченых эндотелиальных маркеров. Эндотелиальный маркер представляет собой маркер, избирательно экспрессируемый в/на эндотелиальных клетках. Указанный эндотелиальный маркер предпочтительно по существу не экспрессируется в или на каком-либо другом типе клеток.

В предпочтительном варианте осуществления флуоресценцию эндотелиального маркера используют, чтобы отсортировать одиночные фетальные клетки.

Такой эндотелиальный маркер может быть выбран из группы, состоящей из Thy-1 CD90, тромбомодулина CD141, человеческого эндоглина CD105, человеческого виментина Vim, васкулярной молекулы клеточной адгезии VCAM, молекулы межклеточной адгезии-1 ICAM, рецептора фактора роста эндотелия сосудов-1 (Flt-1) VEGFR-1, рецептора фактора роста эндотелия сосудов-2 VEGFR-2, рецептора фактора роста эндотелия сосудов-3 VEGFR-3, ингибитора активатора плазминогена-1 PAI-1, эндотелиального рецептора протеина С EPCR, CD146, ITGA5, ITGB5, CDH11, CDH3 и CD59.

В предпочтительных вариантах осуществления эндотелиальный маркер представляет собой CD105 и/или CD141.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления эндотелиальный маркер представляет собой CD90, CD105 и CD141.

5 Агенты для флуоресцентного мечения, специфичные к эндотелиальному маркеру, ковалентно конъюгируют, как известно специалисту в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления они конъюгируют с Alexa Fluor-488. В еще одном предпочтительном варианте осуществления они конъюгируют с FITC.

10 В одном из вариантов осуществления используют маркер, специфичный к материнским клеткам крови. Подходящим маркером для материнских клеток будут маркеры, не экспрессирующиеся на фетальных клетках. Предпочтительным маркером является маркер лейкоцитов.

В предпочтительных вариантах осуществления материнский маркер представляет собой маркер клеток крови, такой как CD14 и/или CD45.

15 В еще одном предпочтительном варианте осуществления маркер клеток крови представляет собой комбинацию маркеров, специфичных к CD3, CD14, CD15, CD16 и CD19.

20 Особенностью изобретения является специфическое мечение клеток с использованием агентов для флуоресцентного мечения. Эти агенты могут представлять собой молекулы любого типа, способные специфически связываться с определенным типом клеток, например, посредством связывания с маркером на поверхности или внутри клеток.

Одной из предпочтительных групп агентов для флуоресцентного мечения являются антитела.

25 Агент для мечения согласно изобретению может представлять собой антитело, такое как любое подходящее антитело, известное в данной области техники, включая другие иммунологически активные фрагменты антител или одноцепочечные антитела. Молекулы антител обычно представляют собой молекулы Y-образной формы, основной элемент которых состоит из четырех полипептидов – двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, ковалентно связанных дисульфидными связями. Каждая из этих цепей свернута в отдельные домены. С-концевые области как тяжелой, так и легкой цепей являются консервативными по последовательности и называются константными областями, также известными как С-домены. N-концевые области, также известные как V-домены, различаются по последовательности и отвечают за
30 специфичность антитела. Антитело специфически распознает антиген и связывается с ним
35

в основном посредством шести коротких определяющих комплементарность областей, расположенных в его V-доменах.

Агент для мечения может представлять собой один фрагмент, например, полипептид или белок, или он может включать два или более фрагментов, например, пару полипептидов, такую как пара доменов одноцепочечных антител. Способы получения антител хорошо известны специалисту в данной области техники и включают стратегии иммунизации для получения моноклональных или поликлональных антител или способы *in vitro* для создания альтернативных связывающих элементов. Поликлональные антитела могут представлять собой, например, поликлональное антитело овцы, козы, кролика или крысы.

Кроме того, может быть использована любая подходящая молекула, способная к связыванию с высокой аффинностью, включая фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), в частности, антитела Fab и scFv, которые могут быть получены с помощью фагового дисплея (см. ниже), или однодоменные антитела (VHH), или химерные антитела. Агент для мечения может быть получен из встречающегося в природе белка или полипептида; он может быть сконструирован *de novo* или он может быть выбран из библиотеки. Например, агент для мечения может быть получен из антитела, одноцепочечного антитела (scFv), однодоменного антитела (VHH), липокалина, одноцепочечной молекулы MHC, AnticalinTM (Pieris), AffibodyTM, нанотела (Ablynx) или TrinectinTM (Phylos). Таким образом, способы создания связывающих элементов различных типов хорошо известны в данной области техники.

В одном из вариантов осуществления изобретения агент для мечения представляет собой фрагмент антитела, предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент или переменную область. Примеры фрагментов антител, подходящих для использования в настоящем изобретении, включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv. Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых Fab-фрагментом, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный "Fc"-фрагмент, названный так из-за его способности легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает F(ab')₂-фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих фрагмента, которые способны перекрестно связывать антиген, и еще один остаточный фрагмент (называемый pFc').

Дополнительные фрагменты могут включать диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящее изобретение относится к агентам для мечения, полученным из встречающегося в природе белка или полипептида; указанный белок или полипептид могут, например, быть сконструированы de novo или могут быть выбраны из библиотеки. Агент для мечения может представлять собой один фрагмент, например, полипептидный или белковый домен, или он может включать два или более фрагментов, например, пару полипептидов. Агент для мечения может представлять собой, но не исключительно, липокалин, одноцепочечную молекулу МНС, Anticalin™ (Pieris), Affibody™ (Affibody) или Trinectin™ (Phylos), нанотела (Ablynx). Агент для мечения может быть выбран или сконструирован рекомбинантными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

В еще одном варианте осуществления изобретения агент для мечения представляет собой аффитело, такое как любое подходящее аффитело, известное в данной области техники, в частности, антитела, как определено в настоящем документе, такие как аффитела или иммунологические фрагменты аффител. Аффитела выбирают in vitro из библиотеки аффител, созданной с помощью комбинаторного варьирования связывающего домена IgG к белку А. Белок А представляет собой поверхностный белок из бактерии *Staphylococcus aureus*. Связывающий домен состоит из 58 остатков, из которых 13 рандомизированы для создания библиотек Affibody®. Следовательно, размер аффитела значительно меньше, чем антитела (www.affibody.com).

Наконец, агент для мечения может представлять собой рецепторный лиганд, непосредственно или опосредованно связанный с флуорофором.

Соответственно, предмет настоящего изобретения является обеспечение селективного мечения фетальных клеток в материнском биологическом образце на основе способа гибридизации. В качестве альтернативы могут быть использованы зонды, распознающие мРНК, селективно экспрессируемую фетальными клетками.

В качестве маркеров фетальных клеток могут быть использованы последовательности РНК, специфичные для фетальных клеток, как правило, матричной РНК (мРНК). Наличие такой мРНК указывает на то, что ген фетального белка транскрибируется и экспрессируется. Зонды, используемые для мечения фетальных клеток в образце, содержащем фетальные и материнские клетки, включают молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности молекулы РНК, кодирующей конкретный белок. Фетальные клетки содержат уникальные молекулы мРНК или РНК, которые не встречаются в других типах клеток. Обнаружение этих РНК может служить для мечения клеток фетального происхождения.

Аналогичным образом, материнские клетки могут быть мечены с использованием зонда, специфичного к мРНК материнской клетки.

Согласно изобретению зонд может представлять собой зонд любого типа, известный в данной области техники как подходящий для обнаружения молекул РНК или ДНК. Обычные зонды, известные специалисту в данной области техники, включают РНК- и ДНК-зонды, синтезированные из нуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов, соответственно, с использованием коммерческого синтезатора. Зонды могут состоять из природных нуклеотидных оснований или известных аналогов природных нуклеотидных оснований. Также предполагается, что зонды могут представлять собой олигомеры, содержащие один или более аналогов нуклеотидов, включая пептидо-нуклеиновые кислоты и другие синтетические молекулы, способные к спариванию оснований по Уотсону-Крику.

Для обнаружения хромосомной ДНК часто используют флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH).

В одном из вариантов осуществления агент для мечения (такой как антитело) или синтетический зонд метят непосредственно путем ковалентного присоединения к нему флуорофоров. В еще одном варианте осуществления агент для мечения (такой как антитело) или синтетический зонд метят опосредованно путем связывания вторым агентом, к которому ковалентно присоединены флуорофоры. Связывание таких зондов или агентов для мечения с мишенью в клетке можно наблюдать под микроскопом как яркую флуоресценцию, или можно регистрировать с помощью FACS.

Используя комбинацию способов мечения, можно усилить сигналы от фетальных клеток, тем самым облегчая их идентификацию.

Для повышения вероятности и/или селективности идентификации фетальных клеток на фоне материнских клеток может быть проведено два или более видов селективного мечения. Два или более видов мечения могут представлять собой комбинацию любых видов мечения, используемых для одиночного мечения, описанных выше. Соответственно, комбинированное мечение может быть осуществлено с использованием двух или более разных гибридизационных зондов, таких как комбинация ДНК-зонда и ПНК (пептидо-нуклеиновая кислота)- или LNA (закрытая нуклеиновая кислота)-зонда для гибридизации с одной и той же фетальной РНК или, более предпочтительно, с разными фетальными РНК. Кроме того, может быть использовано два или более разных ДНК-зондов (или ПНК-зондов, или подобных зондов, способных к специфической гибридизации) для гибридизации с разными фетальными РНК. Аналогичным образом может быть использована комбинация разных агентов для

мечения, обладающих специфичностью к одному и тому же фетальному антигену, либо специфичностью к разным антигенам. В дополнительных вариантах осуществления может быть осуществлено мечение комбинацией нуклеотидных зондов и агентов для мечения.

Флуорофор выбирают, исходя из того, чтобы он испускал в области рабочих длин волн устройства для обнаружения и, кроме того, в подходящей комбинации с необязательным вторым видом мечения. В частности, флуорофоры могут быть выбраны из FITC (флуоресцеин-изофлуоцианат) или TRITC (тетраметилродамин-изофлуоцианат), имеющих возбуждение при 495 нм и 520-530 нм, соответственно. Другие флуорофоры, которые могут быть использованы, перечислены в следующих таблицах, где указаны длины волн возбуждения и испускания различных флуорохромов:

Таблица 1a: Реакционноспособные и конъюгированные зонды

Флуорохром	Возб. (нм)	Исп. (нм)	MW	Примечание
Гидроксикумарин	325	386	331	Сукцинимидиловый эфир
Аминокумарин	350	445	330	Сукцинимидиловый эфир
Метоксикумарин	360	410	317	Сукцинимидиловый эфир
Cascade Blue	375; 400	423	596	Гидразид
Lucifer yellow	425	528		
NBD	466	539	294	NBD-X
R-фикоэритрин (PE)	480; 565	578	240	
Конъюгаты PE-Cy5	480; 565; 650	670		он же Cychrome, R670, Tri-Color, Quantum Red
Конъюгаты PE-Cy7	480; 565; 743	767		
Конъюгаты APC-Cy7	650; 755	767		PharRed
Red 613	480; 565	613		PE-Texas Red
Флуоресцеин	495	519	389	FITC; чувствительный к pH
FluorX	494	520	587	(AP Biotech)
BODIPY-FL	503	512		
Тетраметилродамин	550	560- 608	444	TRITC
Тетраметилродамин изотиоцианат	547	530- 560		
Родамин X	570	576	548	XRITC
Lissamine Родамин В	570	590		
PerCP	490	675		Перидинин-хлорофилл- белковый комплекс
Texas Red	589	(603) 615	625	Сульфонилхлорид
Аллофикоцианин (APC)	650	660	104	
TruRed	490, 675	695		Конъюгат PerCP-Cy5.5

Таблица 1b: Красители Alexa Fluor (молекулярные зонды)

Флуорохром	Возб. (нм)	Исп. (нм)	MW
Alexa Fluor 350	346	445	410
Alexa Fluor 430	430	545	701
Alexa Fluor 488	494	517	643
Alexa Fluor 532	530	555	724
Alexa Fluor 546	556	573	1079
Alexa Fluor 555	556	573	1250
Alexa Fluor 568	578	603	792
Alexa Fluor 594	590	617	820
Alexa Fluor 633	621	639	1200
Alexa Fluor 647	650	668	1250
Alexa Fluor 660	663	690	1100
Alexa Fluor 680	679	702	1150
Alexa Fluor 700	696	719	
Alexa Fluor 750	752	779	

Таблица 1с: Красители Spectrum (Vysis)

Флуорохром	Возб. (нм)	Исп. (нм)
SpectrumOrange	559	588
SpectrumGreen1	497	524
SpectrumGreen2	509	538
SpectrumAqua	433	480
SpectrumBlue	400	450
SpectrumGold	530	555
SpectrumRed	592	612
SpectrumFRed (дальний красный)	655	675

Таблица 1d: Красители Cy (AP Biotech)

Флуорохром	Возб. (нм)	Исп. (нм)	MW
Cy2	489	506	714
Cy3	(512); 550	570; (615)	767
Cy3.5	581	596; (640)	1102
Cy5	(625); 650	670	792
Cy5.5	675	694	1128
Cy7	743	767	818

Немеченные агенты для мечения могут быть использованы, как известно в данной области техники, с помощью второй стадии мечения, например, вторичным антителом к немеченому первичному антителу, где указанное антитело мечено, как описано выше, например, мечено флуорофором. С помощью этого двухстадийного процесса возможно усилить сигналы от фетальных клеток. Могут быть включены дополнительные стадии обнаружения с использованием непрямого мечения, как описано ниже в настоящем документе.

Флуоресцентно меченые антитела могут быть мечены, непосредственно или опосредованно, по меньшей мере одним флуорофором. Специалист в данной области техники сможет выбрать подходящие флуорофоры, и они могут представлять собой любой флуорофор, такой как Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, флуоресцеин изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE), BV421.

При использовании более одного эпителиального маркера эти маркеры могут быть связаны с одним и тем же флуорофором. Это связано с тем, что часто нет необходимости различать клетки, имеющие разные маркеры. То же самое относится к случаям, когда используется более одного эндотелиального маркера и/или когда используется более одного маркера материнских клеток.

Опосредованное мечение флуоресцентно меченых агентов может быть осуществлено путем присоединения флуорофора ко вторичным антителам, связывающим агент для мечения, связанный с маркерами.

В предпочтительном варианте осуществления вторичное антитело может быть выбрано из FITC (флуоресцеин-изофлуоцианат) или TRITC (тетраметилродамин-изофлуоцианат), имеющих возбуждение при 495 нм и 520-530 нм, соответственно. Другие флуорофоры, которые могут быть использованы, перечислены в приведенной выше таблице.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления вторичное антитело может быть выбрано из Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 555, имеющих возбуждение при 490 нм и 555 нм, соответственно.

Поскольку проточный цитометр улавливает более мелкие частицы и количественно определяет в том числе и их параметры, предпочтительно использовать маркер для эукариотической клетки. Для специалиста в данной области техники такой краситель обычно будет представлять собой ДНК-интеркалирующий краситель, и может представлять собой такие красители, как любой краситель Hoechst, DAPI, пропидий йодид, 7-AAD, красители Vybrant DyeCycle, красители SYTOX или красители SYTO.

В еще одном варианте осуществления краситель представляет собой краситель Vybrant DyeCycle Ruby.

Предметом настоящего изобретения является создание полуавтоматизированных или полностью автоматизированных способов выделения одиночных фетальных клеток путем анализа клеток, отсортированных в сортировщике клеток, с помощью одного или более измеренных параметров, используемых, чтобы отличить фетальные клетки от материнских клеток и детрита. Измеренные параметры могут быть использованы для классификации по признаку фетального происхождения. Таким образом можно идентифицировать одиночные отсортированные клетки, которые являются фетальными или с высокой вероятностью могут являться фетальными. Выделенные клетки могут быть использованы для генетического анализа фетального генотипа.

Один из аспектов изобретения относится к способу выделения фетальных клеток из биологического образца беременной женщины, включающему стадии:

а. обеспечения биологического образца от указанной беременной женщины, содержащего клеточную фракцию,

б. приведения клеток, содержащихся в указанной клеточной фракции, в контакт с одним или более агентами для флуоресцентного мечения, специфичными к по меньшей мере одному эпителиальному маркеру и/или эндотелиальному маркеру фетальных клеток,

с. сортировки указанных клеток способом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), основанным на обнаружении указанных одного или более агентов для флуоресцентного мечения, связанных с клетками, и

д. идентификации фетальных клеток среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения.

В одном из вариантов осуществления клеточную фракцию обогащают фетальными клетками перед проведением FACS.

Обогащение может включать обогащение клетками, экспрессирующими по меньшей мере один эндотелиальный маркер. Примеры эндотелиальных маркеров описаны в настоящем документе.

5 В предпочтительном варианте осуществления, чтобы отличить фетальные клетки от материнских клеток, используют классификацию по признаку фетального происхождения. В идеале это осуществляется с такой высокой достоверностью, что нет необходимости верифицировать фетальное происхождение, как описано ниже.

10 В одном из вариантов осуществления классификация по признаку фетального происхождения представляет собой бинарную классификацию, определяющую клетку как фетальную или нефетальную. Указанная классификация по признаку фетального происхождения может быть рассчитана с использованием искусственного интеллекта, нейронной сети, ансамбля решающих деревьев, машинного обучения, регрессионного анализа или деревьев классификации с использованием набора для обучения, содержащего фетальные и материнские клетки верифицированного происхождения.

15 В некоторых вариантах осуществления классификация по признаку фетального происхождения является бинарной, то есть каждая клетка классифицируется как вероятно фетальная или как маловероятно фетальная. В других вариантах осуществления классификатор присваивает каждой клетке вероятность фетального происхождения.

20 В некоторых вариантах осуществления классификацию по признаку фетального происхождения рассчитывают на основании верифицированного происхождения фетальной клетки. Например, верификацию происхождения фетальных клеток осуществляют путем получения фетального генотипа для индивидуально отсортированных клеток, как описано ниже.

25 Классификацию по признаку фетального происхождения рассчитывают на основании параметров, определенных в ходе FACS для каждой клетки. Таким образом, способ присваивает каждой отсортированной клетке определенную классификацию по признаку фетального происхождения. После сортировки клеток из одного материнского образца конечным результатом может быть отсортированный массив клеток с ассоциированной классификацией по признаку фетального происхождения. Данные
30 организуют таким образом, чтобы можно было связать каждую отсортированную клетку с определенной классификацией по признаку фетального происхождения.

На следующих стадиях генетического анализа клеток можно начать с клеток, которым присвоена самая высокая вероятность фетального происхождения, и при необходимости можно продолжить со следующим по величине значением и т. д. Для
35 анализа ДНК в фетальной клетке требуется только одна клетка из плода. Для большей

уверенности может быть предпочтительным проанализировать более одной клетки из плода, например, по меньшей мере 3 клетки из одного и того же плода.

Вероятность может быть рассчитана с помощью функции, полученной из регрессии с использованием набора для обучения, содержащего фетальные и материнские клетки верифицированного происхождения.

В предпочтительном варианте осуществления регрессионный анализ представляет собой логистическую регрессию.

Специалисту в данной области техники известно, что логистическая регрессия представляет собой либо натуральный, либо десятичный логарифм. Для расчета вероятности логистическая регрессия включает постоянный параметр и конкретные значения параметров, полученные в результате количественной оценки флуоресценции.

В одном из вариантов осуществления биологический образец представляет собой образец крови, такой как образец периферической крови.

Образец крови может иметь объем 5-30 мл. Образцы могут быть взяты в любую пробирку, подходящую для образцов крови.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления образец крови может иметь объем 2-100 мл, например, 3-70, 5-50 мл, 5-30 мл и 10-30 мл.

В одном из вариантов осуществления проводят отделение клеточной фракции от биологического образца, в соответствующих случаях путем центрифугирования указанного биологического образца. Центрифугирование биологического образца предпочтительно проводят в течение от 0 до 25 минут, более предпочтительно от 0 до 15 минут и наиболее предпочтительно от 5 до 10 минут. Центробежная сила, приложенная к образцу, предпочтительно составляет от 0 до 5000 G, более предпочтительно от 500 до 3000 G и наиболее предпочтительно от 1000 до 2000 G, например, 1600 G.

Специалисту в данной области техники известно, как проводится центрифугирование для разделения образца крови на плазменную и клеточную фракции. Клеточная фракция будет содержать эритроциты, лейкоциты (белые кровяные тельца) и фетальные трофобласты, фетальные вневорсинчатые трофобласты и фетальные эндovasкулярные трофобласты.

В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой цервикальный мазок. Слизь с тампона сначала может быть растворена с помощью уксусной кислоты или DDT (дихлородифенилтрихлорэтан). Клеточная фракция, полученная в результате этой стадии, затем может быть фиксирована в параформальдегиде. Клеточная фракция из цервикального мазка содержит фетальные клетки (трофобласты, такие как цитотрофобласты, синцитиотрофобласты и/или

интерстициальные трофобласты) и клетки плоского эпителия, клетки столбчатого эпителия, лейкоциты и эритроциты. После этого фетальные клетки могут быть обогащены с помощью HLA-G и/или CD105/CD141 и окрашены, как описано в настоящем документе для образцов крови.

5 В одном из вариантов осуществления изобретения фиксация клеток материнского образца значительно увеличивает стабильность фетальных клеток в материнском образце, позволяя при этом проводить обогащение и идентификацию фетальных клеток, например, как описано выше в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления
10 процедура фиксации может быть проведена на необогащенном образце сразу после взятия образца (т. е. стадии (а) способа, описанного в первом варианте осуществления), что приводит к фиксации клеточных компонентов в материнском образце. В то же время фиксация является настолько мягкой, что материнские эритроциты могут быть селективно лизированы на последующей стадии лизиса.

Фиксацию предпочтительно проводят в течение от 1 до 60 минут. Более
15 предпочтительно фиксацию проводят в течение от 5 до 30 минут, и наиболее предпочтительно фиксацию проводят в течение от 5 до 15 минут, например, 10 минут.

Фиксирующий раствор предпочтительно содержит от 0,5% до 7,5% параформальдегида, более предпочтительно от 1% до 6% и наиболее предпочтительно от 1,5% до 2%.

20 Помимо параформальдегида фиксирующий раствор предпочтительно содержит соль в концентрации от 0,05 М до 0,3 М. Более предпочтительно концентрация соли составляет от 0,1 М до 0,2 М, и наиболее предпочтительной является концентрация от 0,125 М до 0,175 М.

Предпочтительно за стадией фиксации может следовать стадия лизиса
25 эритроцитов, включающая приведение фиксированного образца со стадии (а) в контакт с лизирующим буфером.

Лизирующий буфер обычно содержит неионогенное поверхностно-активное вещество, предпочтительно Triton-X-100. Предпочтительные концентрации поверхностно-активного вещества составляют от 0,01% (мас./мас.) до 0,5%, более предпочтительно от
30 0,05% до 0,3% и наиболее предпочтительно 0,1%.

В предпочтительном варианте осуществления стадию лизиса проводят сразу после стадии фиксации. То есть, как фиксацию, так и лизис проводят после стадии (а) и перед стадией (b) способа, описанного в первом варианте осуществления. То есть, лизирующий раствор добавляют непосредственно к образцу, например, после фиксации в течение 10

минут. Лизис обычно проводят в течение от 1 до 120 минут, более предпочтительно от 5 до 60 минут и наиболее предпочтительно от 6 до 10 минут.

Лизирующий буфер может, помимо лизиса эритроцитов, также создавать небольшие отверстия в клеточных мембранах лейкоцитов, что позволяет агентам для мечения проникать через клеточную мембрану и связываться со своими антигенами-мишенями.

Происхождение фетальных клеток верифицируют путем получения фетального генотипа для индивидуально отсортированных клеток. Когда генотип отличается от материнского генотипа, клетка будет иметь фетальное происхождение. Такая верификация может быть проведена с помощью анализа коротких tandemных повторов (STR-анализ).

В еще одном варианте осуществления верификация может быть проведена, начиная с амплификации генома, и подвергания некоторой части материала анализу коротких tandemных повторов (STR-анализ).

В еще одном варианте осуществления верификацию проводят путем анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), то есть на SNP чипе, после полногеномной амплификации.

В дополнительном варианте осуществления фетальное происхождение верифицируют любыми способами, подходящими для обнаружения генетических маркеров, как описано ниже. Примером такого способа является секвенирование нового поколения (NGS).

Во втором аспекте изобретение относится к способу определения генетической патологии у плода, включающему стадии:

a. получения одной или более фетальных клеток, выделенных способом, как определено в настоящем документе, и

b. обнаружения одного или более генетических маркеров, связанных с указанной генетической патологией, в геноме указанной фетальной клетки.

Генетические маркеры обнаруживают одним или более способами, выбранными из группы, состоящей из RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), саузерн-блоттинга, сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (aCGH), анализа коротких tandemных повторов (STR-анализ), полногеномной амплификации, полногеномного сканирования, SNP чипа, полони-секвенирования, шотган-секвенирования, массивно-параллельного опознавательного секвенирования (MPSS), секвенирования по Сэнгеру, способов на основе ПЦР и способов секвенирования нового поколения.

Способы секвенирования нового поколения могут быть выбраны из группы, состоящей из секвенирования Illumina (Solexa), секвенирования Roche 454, ионного полупроводникового секвенирования Ion torrent: Proton/PGM, и/или секвенирования SOLiD.

5 Генетическая патология представляет собой анеуплоидию, моносомию, полисомию, трисомию, вариацию числа копий (CNV), однонуклеотидную вариацию (SNV) или моногенное расстройство.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, содержащуюся в одиночной фетальной клетке, необходимо амплифицировать, чтобы можно было осуществить
10 способы обнаружения и верификации генетических маркеров.

Было разработано несколько способов для высокоточной полногеномной амплификации, включая множественную амплификацию смещения (MDA), ПЦР с вырожденными праймерами (DOP-PCR) и преамплификацию с удлинением праймеров (PEP). В то время как DOP-PCR и PEP основаны на стандартных способах ПЦР, MDA
15 может быть проведена в условиях изотермической реакции.

Обнаружение/анализ ДНК плода могут быть проведены следующими способами: SNP-генотипирование с помощью наборов праймеров/зондов TaqMan, выявление мутаций на основе кПЦР и ПЦР, секвенирование нового поколения (NGS), анализ коротких
20 tandemных повторов/микросателлитов, секвенирование по Сэнгеру, RFLP и саузерн-блоттинг, и технологий с использованием чипов, таких как сравнительная геномная гибридизация.

Состояния плода, которые могут быть определены на основе описанных в настоящем документе способов и систем, включают наличие плода и/или состояние
25 плода, такое как анеуплоидия плода. Такая патология плода может представлять собой, например, трисомию 13, трисомию 18, трисомию 21 (синдром Дауна), синдром Клайнфельтера (XXY) и другое нарушение числа половых или аутосомных хромосом.

Другие состояния плода, которые могут быть выявлены с помощью описанных в настоящем документе способов, включают сегментарную анеуплоидию, такую как
30 дупликация 1p36, синдром dup(17)(p11.2p11.2), синдром Дауна, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, синдром dup(22)(q11.2q11.2), синдром кошачьего глаза.

В одном из вариантов осуществления подлежащая выявлению патология плода обусловлена одной или несколькими делециями в половых или аутосомных хромосомах. Эти патологии включают болезнь кошачьего крика, синдром Вольфа-Хиршхорна,
35 синдром Вильямса-Бойрена, болезнь Шарко-Мари-Тута, наследственную невропатию со склонностью к параличам от сдавливания нерва, синдром Смит-Магенис,

нейрофиброматоз, синдром Алажиля, велокардиофациальный синдром, синдром Ди Георга, дефицит стероидсульфатазы, синдром Каллмана, микрофтальмию с линейными дефектами кожи, гипоплазию надпочечников, дефицит глицеринкиназы, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, фактор развития семенников Y-хромосомы, азоспермию (фактор а), азоспермию (фактор b), азоспермию (фактор с) или делецию $Ir36$.

В некоторых случаях патология плода представляет собой аномальное уменьшение или увеличение числа хромосом, например, синдром Шерешевского-Тёрнера.

ПРИМЕРЫ

Антитела, упомянутые в разделе примеров, представляют собой конкретные антитела, приведенные в следующей таблице:

Таблица 2. Антитела, использованные в примерах. Антитела с указанием FITC (флуоресцеин изотиоцианат) или PE (фикоэритрин) представляют собой непосредственно конъюгированные антитела.

Антитело	Компания	Каталожный номер
CK7	Abcam	ab181598
CK8	Abcam	ab53280
CK18	Abcam	ab32118
CK19	Abcam	ab52625
СК широкого спектра действия	Abcam	ab9377
CD105-FITC	Miltenyi Biotec	130-098-774
CD141-FITC	Miltenyi Biotec	130-090-513
CD90-FITC	Miltenyi Biotec	130-114-859
CD3-PE	Thermo Fischer Scientific	12-0038-42
CD14	BD Biosciences	551403
CD14-PE	Thermo Fischer Scientific	12-0149-42
CD15-PE	Thermo Fischer Scientific	12-0159-42
CD16-PE	Thermo Fischer Scientific	12-0168-42
CD19-PE	Thermo Fischer Scientific	12-0199-42
CD45	Thermo Fischer Scientific	MA5-17687
Козье антикроличье Alexa Fluor 488	Thermo Fischer Scientific	LifeA11070
Козье антикрысиное Alexa Fluor 555	Thermo Fischer Scientific	LifeA21434

Пример 1 – Обогащение и окрашивание фетальных клеток с помощью MACS с последующим вторым обогащением фетальных клеток с помощью FACS, с последующим сканированием и сбором фетальных клеток с помощью CellCelector

5 Образцы крови были взяты у 13 беременных женщин со сроками гестации от 10 до 14 недель. Образцы обрабатывали и обогащали фетальные клетки следующими способами.

Обработка крови

10 Собирали в общей сложности 30 мл периферической крови в пробирки ВСТ® для бесклеточной ДНК (Streck, Омаха, США). Образцы крови центрифугировали при 1000-2000 g в течение 2-10 минут и удаляли плазму. Образцы крови фиксировали в буфере с 1-10% формальдегида в натрий-фосфатном буфере (PBS) на 2-10 минут с последующим лизисом эритроцитов в 0,1-1% ПАВ Triton-X-100 в PBS в течение 6-10 минут. Затем

клетки промывали буфером PBS с 0,5% бычьего сывороточного альбумина и осаждали перед обогащением фетальных клеток.

Обогащение и окрашивание фетальных клеток с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) от Miltenyi

Обогащение фетальных клеток проводили с помощью MACS (Miltenyi Biotec, Германия). Осажденные необогащенные клетки после "обработки крови" инкубировали с антителами к CD105 и CD141 (микрогранулами) в течение от 15 минут до 1 часа и наносили клеточную суспензию на колонки MACS для обогащения. Удерживаемые клетки погружали в пробирку на 15 мл и промывали (центрифугированием в течение 10 минут) перед повторным нанесением обогащенных клеток на вторую колонку для окрашивания антителами. Окрашивание проводили на колонке путем инкубации обогащенной клеточной фракции с коктейлем первичных антител к цитокератину, нацеленных на фетальные клетки, и антител к CD14 и CD45, нацеленных на материнские лейкоциты, в течение от 15 минут до 1 часа. После инкубации с первичными антителами клетки в колонках трижды промывали PBS. После этого вторичные антитела метили следующими флуоресцентными красителями: применяли Alexa Fluor 488 (AF488) (нацеливание на СК на фетальных клетках) и Alexa Fluor 555 (AF555) (нацеливание на CD14 и CD45 на материнских лейкоцитах) и инкубировали клетки в течение от 15 минут до 1 часа. Окрашенные клетки дважды промывали PBS перед заморозкой посредством погружения и хранили при 4 °C до проведения FACS.

Обогащение фетальных клеток с помощью FACS

К клеткам, обогащенным с помощью MACS, добавляли 20 мкл 5 мкМ Hoechst 33342. Клетки пропускали через прибор FACS для проведения еще одной стадии обогащения (фиг. 2). Фетальные клетки сортировали с помощью FACS Aria III (BD Biosciences, США) с лазерами на 405 нм (Hoechst 33342), 488 нм (Alexa Fluor 488) и 561 нм (Alexa Fluor 555). Сигналы флуоресценции считывали с помощью соответствующих полосовых фильтров: 450/50 нм, 530/30 нм и 585/42 нм. Компенсацию флуоресценции или исключение дублетов не производили. Напряжение на трубке фотоумножителя было задано в соответствии со следующими параметрами: пороговое значение для FSC: 300, SSC: 390, AF488: 360, AF555: 236, Hoechst: 500 и FSC-H: 5000. Применяли сопло диаметром 100 мкм, и прибор FACS был настроен на сортировку в режиме обогащения из-за редкости циркулирующих в периферической крови фетальных клеток. Все клетки были нанесены на точечный график в координатах прямого и бокового светорассеяния

(FSC/SSC). Из фракции Hoechst⁺ на графике флуоресценции AF488/AF555 была выделена область (гейт G1) для сортировки представляющих интерес клеток. Анализ отсортированных клеток проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC, США). Пример гейта G1 с координатами X-Y приведен на фиг. 3. В среднем было отсортировано 2244 клетки. Клетки наносили на предметные стекла и классифицировали с помощью CellCelector (флуоресцентный сканер-сборщик клеток). Среди отсортированных клеток было 107 фетальных клеток, в среднем 7,9 фетальных клеток на образец (таблица 3).

Таблица 3: Образцы крови от тринадцати беременных женщин обрабатывали, как описано в тексте, и дополнительно обогащали фетальные клетки с помощью FACS. В среднем в FACS было зарегистрировано 342000 событий на образец, и было выделено 7,9 фетальных клеток на образец.

Образец №	Исследование	Гейт	Точность сортировки	Общее кол-во событий	Кол-во отсорт-х клеток	Идентиф-но фетальных клеток
HR725	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	171,739	1567	4
AALb149	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	327,956	664	3
HR726	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	201,719	355	5
HR729	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	394,992	1770	2
HR730	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	514,347	3480	16
HR731	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	694,326	2723	14
HR732	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	277,761	1405	10
HR733	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	283,559	2192	16
HE80	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	н/д	2030	2
HR734/MD23	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	352,250	5831	2
HR735	FACS: CD14-CD45_Гейт1	G1	Обогащение	271,748	916	3

	CD45_Гейт1					
HR736	FACS: CD14-	G1	Обогащение	313,574	4731	25
	CD45_Гейт1					
AAL163	FACS: CD14-	G1	Обогащение	301,522	1503	1
	CD45_Гейт1					

Пример 2 – Обогащение и окрашивание фетальных клеток с помощью MACS с последующей сортировкой одиночных клеток с помощью FACS для получения фетальных клеток

5 Образцы крови объемом 30 мл были взяты у 13 беременных женщин со сроками гестации от 10 до 14 недель. Образцы обрабатывали и обогащали фетальные клетки на магнитных гранулах, окрашивали с использованием вышеуказанных способов и прогоняли через прибор FACS Aria III с настройками, как описано в примере 1. И использовали сортировочный гейт (G7) на графике FACS с Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 10 555 (PE) для сбора всех клеток в этом гейте индивидуально в отдельные пробирки для ПЦР, содержащие 5 мкл буфера TE, с частотой событий прикл. 100-600 событий в секунду (фиг. 5). Отсортированные клетки замораживали при -80 °C. С использованием этого гейта в среднем было собрано по 17 клеток из каждого образца. Затем клетки подвергали анализу коротких tandemных повторов (STR) для выяснения их происхождения 15 (фетальное или материнское) (фиг. 4). Перед проведением STR-анализа фетальные клетки лизировали с помощью PrepGem Universal (Zygem, Новая Зеландия) в соответствии с инструкциями производителя. STR-профиль генотипа получали путем определения размера фрагментов способом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3500. Анализ данных проводили на программном обеспечении для анализа размера 20 фрагментов GeneMapper ID-X (Thermo Fischer Scientific, США). Результаты STR-анализа одиночных отсортированных клеток представлены в таблице 4 и на фиг. 6.

Образец	Отсорти- ровано клеток/гейт	Феталь ные клетки	Матери нские клетки	Без сигналов STR (пустые пробирки)	Фетальные клетки с загрязнением материнскими клетками	Фетальные клетки с загрязнением неизвестным материалом
2703	33	5	25	1	1	0
2711	4	3	0	1	0	0
2712	7	3	3	0	1	0

2726	47	34	7	2	2	2
2727	17	8	9	0	0	0
2733	6	3	3	0	0	0
2734	25	12	12	1	0	0
2741	9	8	1	0	0	0
2742	4	4	0	0	0	0
2748	20	10	10	0	0	0
2749	31	11	18	2	0	0
HR752	10	8	0	0	1	0
2754	14	12	2	0	0	0

Таблица 4: Данные для образцов после сортировки одиночных клеток. Происхождение клеток (фетальное или материнское) выясняли с помощью STR-анализа. 13 последовательных образцов обогащали с использованием микрогранул к CD105 и CD141 с помощью MACS, а затем проводили сортировку одиночных клеток с помощью FACS Aria III с использованием окрашивания цитокератина, CD45, CD14 и Hoechst. Было отсортировано от 4 до 47 клеток, и STR-анализ выявил от 3 до 36 фетальных клеток среди отсортированных клеток, в среднем 9,6 фетальных клеток на образец.

Из 13 последовательных образцов было отсортировано от 4 до 47 клеток, в среднем 17,5 клеток (таблица 4). С помощью STR-анализа было идентифицировано от 3 до 36 фетальных клеток, что дает в среднем 9,6 фетальных клеток. Сравнение с примером 1 (идентифицировано 7,9 фетальных клеток) показывает, что выделение одиночных клеток возможно при FACS-сортировке MACS-обогащенного образца.

К этому моменту было известно происхождение (фетальное или материнское) всех одиночных отсортированных клеток. Кроме того, для каждой клетки было известно зарегистрированное значение для 5 разных параметров (прямое светорассеяние (FSC-A), боковое светорассеяние (SSC-A), Hoechst Blue-A (ядерный краситель), Alexa Fluor 488-A (антитела, нацеленные на СК на фетальных клетках) и Alexa Fluor 555 (PE-A)

(нацеливание на CD14 и CD45 на материнских лейкоцитах) на приборе FACS. Учитывая всю эту информацию, авторы разработали модель, используя математический способ, называемый логистической регрессией, для прогнозирования вероятности определения фетальных клеток для будущих образцов, где информация по STR будет недоступна.

5

Модель:

Модель для прогнозирования фетальных клеток основана на математическом способе, называемом логистической регрессией, который для каждого образца дает вероятность того, является ли одиночная отсортированная клетка фетальной.

10

Логистическая функция выглядит следующим образом:

$$p(X) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p}}$$

15

Где $X_1, X_2, \dots, X_p$ представляют собой определенные переменные, измеренные для каждой одиночной отсортированной клетки. Как уже упоминалось, в данном случае имелось пять переменных (FSC-A, SSC-A, Hoechst Blue-A, Alexa Fluor 488-A и PE-A), измеренных прибором FACS. X_1, X_2, X_3, X_4 и X_5 соответствуют значениям, зарегистрированным для FSC-A, SSC-A, Hoechst Blue-A, Alexa Fluor 488-A и Alexa Fluor 555 (PE-A) для каждой клетки, соответственно.

20

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$ представляют собой коэффициенты или постоянные значения в уравнении. В данном случае имелось шесть коэффициентов, где β_0 является обособленным (отражает вероятность, когда все пять переменных равны нулю), $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ и β_5 отражают влияние FSC-A, SSC-A, Hoechst Blue-A, Alexa Fluor 488-A и Alexa Fluor 555 (PE-A), соответственно, на вероятность того, что клетка является фетальной или материнской. Однако это влияние не отражается на их абсолютных значениях. Эти шесть коэффициентов являются постоянными значениями, которые рассчитывают из набора данных для "обучения", в котором известно происхождение клеток (фетальное или материнское) и значения всех пяти переменных для каждой клетки (текущий набор данных состоит из 121 фетальной клетки и 90 материнских клеток). Эти значения β рассчитывают таким образом, чтобы для всех клеток в наборе данных для "обучения" фетальные клетки получали как можно более высокую вероятность (близкую к 1), а материнские клетки – как можно более низкую вероятность (близкую к 0). Эти значения β ($\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ и β_5), представленные в таблице 5, уникальны для данных из этого эксперимента.

30

Коэффициенты	Значения
β_0	0,9064212
β_1	0,0000254
β_2	-0,0000064
β_3	0,0000325
β_4	-0,0000171
β_5	-0,0032858

Таблица 5: Коэффициенты, рассчитанные на основе набора данных из 121 фетальной клетки и 90 материнских клеток, для которых были известны значения различных переменных, измеренных прибором FACS.

При применении этого алгоритма для каждой одиночной отсортированной клетки в образце $p(X)$ даст значение от 0 до 1. Чем выше значение $p(X)$ для данной клетки, тем выше алгоритм оценивает вероятность того, что эта клетка является фетальной клеткой. Авторы применили эту модель на трех образцах, отсортированных на одиночные клетки, чтобы проверить, возможно ли увеличить количество фетальных клеток, если ориентироваться только на 50% клеток с самой высокой вероятностью фетального происхождения. Количество фетальных клеток после сортировки варьировало в интервале 38-83%, и при ориентировании на клетки с самой высокой вероятностью оно значительно возросло. Результаты приведены в таблице 6.

Образец	Всего отсортировано клеток	Подтвержденные фетальные клетки (по STR)	Подтвержденные материнские клетки (по STR)	% фетальных клеток во всей популяции	% фетальных клеток в половине с самой высокой вероятностью фетальных (с помощью алгоритма)
2726	41	34	7	83%	95%
2749	29	11	18	38%	78,5%
2734	24	12	12	50%	58,4%

Таблица 6: Данные для трех образцов, подвергнутых сортировке одиночных клеток, на которых была протестирована модель прогнозирования фетальных клеток с использованием логистической регрессии. Во всех трех образцах количество фетальных клеток было повышено в первой половине образца, для которой была определена высокая вероятность фетального происхождения. Это улучшило бы производительность, а также снизило COGS (себестоимость реализованной продукции) последующих генетических анализов на одиночных фетальных клетках.

Осуществлена практическая реализация модели для прогнозирования определения фетальных клеток на различных графиках FACS с использованием описанного выше подхода, технологический процесс соответствует показанному на фиг. 7. После сортировки одиночных клеток ДНК во всех клетках будет амплифицирована с использованием полногеномной амплификации (WGA). Затем часть продукта WGA будет использована для проведения STR-анализа. Остальная часть ДНК из клеток, которые окажутся фетальными, затем будет использована для генетического анализа с использованием aCGH или любого другого подходящего способа последующего анализа.

Пример 3 – Обогащение фетальных клеток с помощью FACS с последующим сканированием и сбором фетальных клеток с помощью CellCelector

Чтобы изучить возможность выделения фетальных клеток с помощью FACS без необходимости обогащения фетальных клеток посредством MACS-обогащения, были взяты образцы крови объемом 10 мл у восьми беременных женщин со сроками гестации от 10 до 14 недель. Образцы крови обрабатывали и осаждали лейкоциты, как описано в примере 1. После обработки крови клетки окрашивали различными концентрациями коктейля только из антител к СК, в 4 образцах, и коктейля из антител к СК и антител к CD14 и CD45, в 4 образцах. Клетки, лежащие в гейте G1 на графике FACS для Alexa-Fluor 488 и Alexa Fluor 555 (PE), были отсортированы, как в примере 1. В среднем было зарегистрировано 55 млн событий и из каждого образца было отсортировано по 22140 клеток. Клетки наносили на предметные стекла и классифицировали с помощью CellCelector (флуоресцентный сканер-сборщик клеток). В среднем было извлечено 4 фетальные клетки из 10 мл цельной крови, что свидетельствует о возможности проведения обогащения только с помощью FACS (таблица 7).

Образец	Гейт	Точность сортировки	Всего событий	Отсорти- ровано клеток/ гейт	Всего ФК в образце	Антитела к СК (мкл)	Антитела к CD14 + CD45 (мкл)
2537- WB	WB- G1	обогащение	60 млн	14642	4	5	-
2571- WB	WB- G1	обогащение	36 млн	13120	3	5	-
2580- WB	WB- G1	обогащение	60 млн	41454	4	5	-
2581- WB	WB- G1	обогащение	55 млн	27141	6	5	-
2591- WB	WB- G1	обогащение	51 млн	20288	9	3	3
2592- WB	WB- G1	обогащение	55 млн	34184	4	3	3
2637- WB	WB- G1	обогащение	60 млн	17755	2	3	3
2693- WB	WB- G1	обогащение	66 млн	8535	0	3	3

Таблица 7: Данные для 8 образцов, для которых было обработано 10 мл крови и клетки сортировали на приборе FACS без предварительного обогащения фетальных клеток

5 Пример 4 – Обогащение и окрашивание фетальных клеток с помощью MACS с последующей сортировкой одиночных клеток с помощью FACS для получения фетальных клеток

10 Чтобы исследовать применимость изобретения на нескольких приборах FACS, авторы провели исследования, как показано в примере 2, с помощью FACS Melody (BD Biosciences, США) вместо FACS Aria III. В следующем примере авторы показывают, что фетальные клетки могут быть идентифицированы из 30 мл крови, которая была обработана, обогащена с помощью антител, специфичных к эндотелиальным маркерам (CD105 и CD141) на платформе MACS, и затем окрашена на эпителиальные маркеры (СК), как описано в примере 1. Проводили сортировку одиночных клеток из обогащенных и окрашенных клеток с помощью FACS Melody (BD Biosciences, США) с использованием окрашивания цитокератина, CD45, CD14 и Hoechst.

Сортировка одиночных клеток с помощью FACS

20 Непосредственно перед проведением FACS к обогащенному осадку клеток добавляли 20 мкл 5 мкМ раствора Hoechst 33342 для окрашивания ядер.

Обогащенные и окрашенные клетки сортировали с помощью FACS Melody (BD Biosciences, США) с лазером на 405 нм, 488 нм и 561 нм. Сигналы флуоресценции регистрировали с помощью соответствующих полосовых фильтров: 448/45 нм (Hoechst 33342), 527/32 нм (AF488) и 585/40 нм (AF555). Компенсацию флуоресценции или
 5 исключение дублетов не производили. Напряжение на трубке фотоумножителя было задано в соответствии со следующими параметрами: пороговое значение для FSC: 278, SSC: 530, AF488: 336, AF555: 271, Hoechst: 470 и FSC: 2939. Применяли сопло диаметром 100 мкм, и прибор FACS был настроен на сортировку в режиме обогащения из-за редкости циркулирующих в периферической крови фетальных клеток.

10 Сначала исключали все события (детрит) с очень высоким боковым светорассеянием (SSC), а оставшиеся клетки гейтировали по событиям Hoechst⁺. Затем события Hoechst⁺ гейтировали по СК⁺ и CD45⁻ и CD14⁻. Пример стратегии гейтирования приведен на фиг. 8. Клетки по отдельности сортировали в пробирки для ПЦР на 200 мкл, содержащие 5 мкл буфера ТЕ, с частотой событий прикл. 100-600 событий в секунду.
 15 Отсортированные клетки замораживали при -80 °С. Затем клетки подвергали анализу коротких tandemных повторов (STR) для выяснения их происхождения (фетальное или материнское), как описано в примере 2.

Экспериментальные результаты примера 4

20 Как видно из таблицы 8, из 9 последовательных образцов было отсортировано от 10 до 26 клеток, в среднем 17,9 клеток. С помощью STR-анализа было идентифицировано от 0 до 16 фетальных клеток на образец, в среднем 7,0 фетальных клеток. Сравнение с примером 1 (идентифицировано 7,9 фетальных клеток) и примером 2 (выделено 9,6 фетальных клеток) показывает, что выбор прибора для FACS не влияет на результат
 25 изобретения.

Номер образца	Отсортированные клетки	Фетальные клетки
HR843	20	11
HR847	13	7
3057	12	6
HR850	26	16
HR851	22	11
HR854	22	8
HR855	10	2
HR856	14	0
HR857	22	2

Таблица 8: 9 последовательных образцов обогащали с использованием микрогранул к CD105 и CD141 с помощью MACS, а затем проводили сортировку одиночных клеток с помощью FACS Melody с использованием окрашивания цитокератина, CD45, CD14 и Hoechst. Было отсортировано от 10 до 26 клеток, и STR-анализ выявил от 0 до 16 фетальных клеток среди отсортированных клеток, в среднем 7,0 фетальных клеток.

Пример 5 – Обогащение фетальных клеток с помощью FACS с последующей сортировкой одиночных клеток с помощью FACS для получения фетальных клеток

Чтобы выяснить, можно ли избежать обогащения с помощью MACS, авторы заменили MACS-обогащение FACS-обогащением с последующей сортировкой одиночных клеток на приборе FACS. Другими словами, клетки проходили "двойную FACS". FACS-обогащение удалило большую часть материнских клеток и детрита, что позволило провести последующую сортировку одиночных клеток с получением фетальных клеток без загрязнения материнскими клетками. Идентификация фетальных клеток в обоих раундах FACS была основана только на окрашивании цитокератина, CD45, CD14 и Hoechst, какие-либо эндотелиальные маркеры не использовали.

Авторы брали образцы крови объемом 10 мл у 10 беременных женщин со сроками гестации 10–14 недель. Обработку крови проводили, как описано в примере 1.

Окрашивание фетальных клеток

После обработки крови клетки, осажденные в пробирке, окрашивали первичными антителами, нацеленными на CK7, CK8, CK18, CK19, CK широкого спектра, CD14 и

CD45, в течение от 15 минут до 1 часа. Затем клетки промывали в PBS, центрифугировали при 550 g в течение 10 минут и удаляли супернатант. Затем добавляли вторичные антитела, меченые AF488 (нацеленные на СК) и AF555 (нацеленные на CD45+CD14), и инкубировали в течение от 15 минут до 1 часа. Клетки дважды промывали и удаляли супернатант до 500 мкл.

Обогащение и сортировка одиночных клеток с помощью FACS

Непосредственно перед сортировкой с помощью FACS Melody клетки окрашивали 500 мкл 20 мкМ раствора Hoechst 33342 и добавляли PBS до конечного объема 4 мл. Настройки FACS были идентичны упомянутым в примере 4.

Сначала исключали все события с очень высоким боковым светорассеянием (SSC), а затем оставшиеся клетки гейтировали по событиям Hoechst⁺. Затем события Hoechst⁺ гейтировали по экспрессии СК от среднего до высокого уровня (СК^{medium-to-high}) и по CD45⁻CD14⁻. Пример гейтирования приведен на фиг. 9. Проводили массовую сортировку клеток в пробирку Эппендорф на 1,5 мл, содержащую 25 мкл PBS, с частотой событий прилб. 5000-20000 событий в секунду. Отсортированные клетки разбавляли до конечного объема 500 мкл, а затем снова сортировали с использованием той же стратегии гейтирования, за исключением того, что гейтирование проводили только по клеткам с высокой экспрессией СК (СК^{high}). Пример гейтирования приведен на фиг. 10. Клетки сортировали на одиночные клетки в пробирки для ПЦР, содержащие 5 мкл буфера TE, с частотой событий прилб. 100-600 событий в секунду. Частота событий была установлена такой низкой, чтобы избежать загрязнения материнскими клетками, поскольку прибор FACS был настроен на сортировку в режиме обогащения. Отсортированные клетки замораживали при -80 °C перед проведением STR-анализа, который проводили, как описано выше.

Экспериментальные результаты примера 5

В таблице 9 приведено количество отсортированных клеток в первой и второй сортировке, а также количество фетальных клеток, идентифицированных с помощью STR-анализа. В первой сортировке было отсортировано прилб. от 15000 до 33000 клеток, а во второй сортировке было отсортировано от 5 до 32 клеток. Затем клетки из второй сортировки анализировали с помощью STR, который выявил от 0 до 9 фетальных клеток на 10 мл крови, в среднем 2,4 фетальные клетки. Отсюда следует, что выделение фетальных клеток можно проводить с помощью только FACS и окрашивания эпителиальных маркеров в комбинации с CD45, CD14 и Hoechst.

Номер образца	Всего событий (млн)	Отсортированные клетки (1-я сортировка)	Отсортированные клетки (2-я сортировка)	Фетальные клетки
3076-WB	49	23490	12	9
3078-WB	29	15271	5	0
3079-WB	44	19287	22	1
3080-WB	48	16983	28	0
3083-WB	46	28827	20	3
3084-WB	57	н/д	20	2
3085-WB	51	32916	30	2
3086-WB	41	22325	17	0
3089-WB	44	16301	32	4
3090-WB	73	н/д	17	3

Таблица 9: 10 последовательных образцов были подвергнуты "двойной сортировке" на приборе FACS Melody. Первая сортировка дала прибл. 15000-32000 клеток, и эти клетки затем снова загружали с помощью FACS и сортировали одиночные клетки. Было отсортировано от 5 до 32 клеток, и STR-анализ показал, что среди клеток, отсортированных на одиночные клетки, имелось от 0 до 9 фетальных клеток, в среднем 2,4 фетальные клетки.

Пример 6 – Обогащение фетальных клеток с помощью FACS с последующей сортировкой одиночных клеток с помощью FACS для получения фетальных клеток – фетальные эндотелиальные маркеры

В этом примере авторы демонстрируют, что "двойная FACS" позволяет идентифицировать фетальные клетки на основе окрашивания только эндотелиальных маркеров (и без окрашивания эпителиальных маркеров).

Авторы брали три образца крови объемом 10 мл у беременных женщин со сроками гестации 10–14 недель. Обработку крови проводили, как описано в примере 1.

Окрашивание фетальных клеток

После обработки крови клетки окрашивали антителами, нацеленными на одно или более из следующих антител: CD105-FITC, CD141-FITC и CD90-FITC, в течение от 15 минут до 1 часа (см. комбинации антител в таблице 10). Кроме того, для окрашивания материнских клеток использовали первичные антитела к CD14 и CD45 и вторичные

антитела, меченые AF555. Затем клетки промывали в PBS, центрифугировали при 550 g в течение 10 минут и удаляли супернатант до 500 мкл.

Обогащение и сортировка одиночных клеток с помощью FACS

Непосредственно перед проведением FACS клетки окрашивали 500 мкл 20 мкМ раствора Hoechst 33342 и добавляли PBS до конечного объема 4 мл. Настройки FACS были идентичны упомянутым в примере 4, за исключением того, что напряжение на трубке фотоумножителя для AF488 было установлено на 461 для непосредственно конъюгированных CD105, CD141 и CD90.

Сначала исключали все события с очень высоким боковым светорассеянием (SSC), а затем фракцию с низким SSC гейтировали по событиям Hoechst⁺. Затем события Hoechst⁺ гейтировали по экспрессии CD105+CD141+CD90 от среднего до высокого уровня. Все клетки гейтировали по CD45⁻ и CD14⁻. Пример гейтирования приведен на фиг. 11. Проводили массовую сортировку клеток в пробирку Эппендорф на 1,5 мл, содержащую 25 мкл PBS, с частотой событий прилб. 5000-20000 событий в секунду. Отсортированные клетки разбавляли до конечного объема 500 мкл, а затем снова сортировали с использованием той же стратегии гейтирования, за исключением того, что сортировали только клетки с высоким уровнем экспрессии CD105+CD141+CD90. Пример гейтирования приведен на фиг. 12. Клетки сортировали на одиночные клетки в пробирки для ПЦР с 5 мкл буфера TE, с частотой событий прилб. 100-600 событий в секунду. Клетки, отсортированные на одиночные клетки, замораживали при -80 °C перед проведением STR-анализа, который проводили, как описано в примере 2.

Номер образца	Окрашивание образца	Всего событий (млн)	Отсортированные клетки (1-я сортировка)	Отсортированные клетки (2-я сортировка)	Фетальные клетки
HO107-A	CD105+CD141+CD90	146	30796	20	1
3091-B	CD105+CD141	57	44567	10	1

Таблица 10: Окрашивание эндотелиальных маркеров. Образец HO107-A окрашивали антителами, нацеленными на CD105+CD141+CD90, и в результате проведения "двойной FACS" была идентифицирована 1 фетальная клетка. Для образца 3091-B окрашивали только CD105 и CD141, и после "двойной FACS" также была обнаружена 1 фетальная клетка.

Экспериментальные результаты примера 6

В таблице 10 показаны 2 образца, окрашенные на различные комбинации эндотелиальных маркеров. Первая сортировка дала прибл. 30000–45000 клеток, тогда как вторая сортировка дала 10–20 клеток. В обоих случаях была обнаружена одна фетальная клетка.

Пример 7 – Обогащение фетальных клеток с помощью FACS с последующей сортировкой одиночных клеток с помощью FACS для получения фетальных клеток – различные маркеры, специфичные для материнских клеток

В предыдущих примерах окрашивание CD45 и CD14 использовали для идентификации материнских лейкоцитов, тогда как Hoechst использовали для окрашивания ядер. Целью этого окрашивания было увеличить разделение между клетками и детритом, а также между материнскими клетками и фетальными клетками. В этом примере авторы исследовали необходимость CD45, CD14 и Hoechst для сортировки одиночных фетальных клеток.

Брали образцы крови объемом 10 мл у 5 беременных женщин со сроками гестации 10–14 недель. Обработку крови проводили, как описано в примере 1. Все образцы окрашивали антителами к СК, как описано в примере 5. Кроме того, все образцы окрашивали Hoechst, а также на CD45 и CD14, как описано в примере 5, если иное не указано в таблице 11. В одном образце лейкоциты были окрашены антителами, нацеленными на CD3, CD14, CD15, CD16 и CD19, все из которых были непосредственно конъюгированы с PE, в течение от 15 минут до 1 часа. Все образцы были обогащены с помощью FACS с использованием окрашивания СК вместе с окрашиванием лейкоцитов и Hoechst, если они были включены в образец, как описано в примере 5. Наконец, клетки сортировали на одиночные клетки на приборе FACS с использованием того же окрашивания, что и для обогащения с помощью FACS. Клетки, отсортированные на одиночные клетки, анализировали с помощью STR.

Номер образца	Окрашивание образца	Всего событий (млн)	Отсортиро- ванные клетки (1-я сортировка)	Отсортиро- ванные клетки (2-я сортировка)	Феталь- ные клетки
AAL302-B	Без Hoechst, CD45 или CD14	33	35000	14	0
AAL302-A	Без CD45 или CD14	54	13234	15	0
KO381	Без CD45	23	4806	7	0
KO380	Без CD14	34	23389	7	3

Таблица 11: Комбинации материнского маркера и Hoechst.

Экспериментальные результаты примера 7

График FACS для образца AAL302-B, который не был окрашен ни Hoechst, ни на CD45 или CD14, приведен на фиг. 13А. Разделение клеток значительно снизилось. Несколько событий, которые были отделены от основной популяции, были отсортированы, но STR-анализ показал, что все отсортированные события не содержали ДНК, т. е. был отсортирован только детрит. Это свидетельствует о том, что окрашивание ядер, такое как Hoechst, необходимо для удаления детрита при сортировке одиночных клеток.

Hoechst:

При добавлении Hoechst, но без окрашивания материнских клеток (образец AAL302-A), четкого разделения не было получено (фиг. 13В). С помощью STR были идентифицированы только материнские клетки, что свидетельствует о том, что окрашивание материнских маркеров значительно повышает отделение фетальных клеток от материнских клеток.

CD14 и CD45:

При окрашивании материнских клеток на CD14, но не на CD45 (образец KO381), было получено разделение, но фетальные клетки не были идентифицированы (фиг. 14А). Однако при проведении окрашивания только CD45, но не CD14 (образец KO380, фиг. 14В), были идентифицированы 3 фетальные клетки, что свидетельствует о важности окрашивания CD45.

Другие маркеры лейкоцитов:

CD45 также известен как общий лейкоцитарный антиген, поскольку он экспрессируется на всех подгруппах лейкоцитов (моноцитах, гранулоцитах, Т-клетках, В-клетках и NK-клетках). Поэтому, чтобы выяснить, можно ли заменить CD45 маркерами, представляющими все подгруппы лейкоцитов, авторы окрашивали CD3 (Т-клетки), CD14 (моноциты), CD15 (гранулоциты), CD16 (NK-клетки) и CD19 (В-клетки) в комбинации с СК и окрашиванием Hoechst, как описано ранее в примере 5. В результате было получено 3 фетальные клетки (таблица 12), что свидетельствует о том, что CD45 может быть заменен группой других маркеров лейкоцитов.

Номер образца	Окрашивание образца	Всего событий (млн)	Отсортированные клетки (1-я сортировка)	Отсортированные клетки (2-я сортировка)	Фетальные клетки
3091-A	CD3, CD14, CD15, CD16 и CD19	57	11058	25	3

Таблица 12: CD3, CD14, CD15, CD16 и CD19 нацелены на разные подгруппы лейкоцитов в периферической крови. Путем окрашивания разных подгрупп вместо CD45, который нацелен на все подгруппы, было идентифицировано 3 фетальные клетки.

Объекты

1. Способ выделения фетальных клеток, включающий стадии:

1. обеспечения биологического образца от женщины, вынашивающей плод,
2. обогащения указанного образца фетальными клетками,
3. приведения указанного образца в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения,
4. сортировки одиночных клеток для получения по меньшей мере одной фетальной клетки из указанного обогащенного образца с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

2. Способ пренатальной диагностики, включающий стадии:

1. получения по меньшей мере одной фетальной клетки, выделенной способом, как определено в пункте 1,
2. получения генотипа из указанной фетальной клетки, и
3. диагностики фенотипа указанного плода.

3. Способ пренатальной диагностики, включающий стадии:

1. обеспечения биологического образца от женщины, вынашивающей плод,
2. обогащения указанного образца фетальными клетками,
3. приведения указанного образца в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения,
4. сортировки одиночных клеток для получения по меньшей мере одной фетальной клетки из указанного обогащенного образца с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS),
5. получения генотипа из указанной фетальной клетки, и
6. диагностики фенотипа указанного плода.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный агент для флуоресцентного мечения является специфичным к ядру, маркеру фетальных клеток и/или маркеру материнских клеток.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный по меньшей мере один агент для флуоресцентного мечения выбран из каждой из групп:

- i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,

- ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
- iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных клеток.

5

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где образец обогащают с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS).

10

7. Способ по пункту 6, где стадии обогащения предшествует стадия приведения клеток, содержащихся в указанном образце, в контакт с по меньшей мере одним магнитно-меченым агентом, специфичным к маркеру фетальных клеток.

15

8. Способ по любому из пунктов 1-5, где образец обогащают с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

20

9. Способ по пункту 8, где стадии обогащения предшествует стадия приведения клеток, содержащихся в указанном биологическом образце, в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения, выбранным из каждой из следующих групп:

- i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,
- ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
- iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных клеток.

25

10. Способ по пункту 9, где указанное обогащение с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS) основано на флуоресценции указанных агентов для флуоресцентного мечения.

30

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанную по меньшей мере одну фетальную клетку, полученную сортировкой одиночных клеток, сортируют с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS) на основании:

- i. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру фетальных клеток,

- ii. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к ядру, и
- iii. отрицательного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру материнских клеток.

5

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанные фетальные клетки представляют собой фетальные трофобласты, такие как вневорсинчатые трофобласты, эндоваскулярные трофобласты, цитотрофобласты и/или синцитиотрофобласты.

10

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эндотелиальному или эпителиальному маркеру.

15

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эндотелиальному маркеру.

20

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный эндотелиальный маркер выбран из Thy-1 CD90, тромбомодулина CD141, человеческого эндоглина CD105, человеческого виментина (Vim), молекулы адгезии сосудистого эндотелия (VCAM), молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-1 (Flt-1) (VEGFR-1), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGFR-2), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-3 (VEGFR-3), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), эндотелиального рецептора протеина C (EPCR), CD146, ITGA5, ITGB5, CDH11, CDH3 и/или CD59.

25

30

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный эндотелиальный маркер представляет собой CD105, CD90 и/или CD141.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный эндотелиальный маркер представляет собой CD105 и/или CD141.

35

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эпителиальному маркеру.

5

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин.

20. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин, такой как человеческий цитокератин 1 СК1, человеческий цитокератин 2 СК2, человеческий цитокератин 3 СК3, человеческий цитокератин 4 СК4, человеческий цитокератин 5 СК5, человеческий цитокератин 6 СК6, человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 9 СК9, человеческий цитокератин 10 СК10, человеческий цитокератин 13 СК13, человеческий цитокератин 14 СК14, человеческий цитокератин 15 СК15, человеческий цитокератин 16 СК16, человеческий цитокератин 17 СК17, человеческий цитокератин 18 СК18, человеческий цитокератин 19 СК19.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин, человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 18 СК18 и/или человеческий цитокератин 19 СК19.

22. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный эпителиальный маркер представляет собой человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 18 СК18 и/или человеческий цитокератин 19 СК19.

23. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанные агенты для флуоресцентного мечения представляют собой антитела, нуклеотидные зонды, рецепторные лиганды и/или другие специфически связывающиеся молекулы.

24. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный по меньшей мере один агент для флуоресцентного мечения непосредственно или опосредованно мечен по меньшей мере одним флуорофором.

35

25. Способ по пункту 40, где указанный флуорофор выбран из группы, состоящей из Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, флуоресцеина изотиоцианата (FITC), фикоэритрина (PE) и BV421.

5 26. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру, выбран из любого красителя Hoechst, DAPI, пропидий йодида, 7-AAD, красителей Vybrant DyeCycle, красителей SYTOX или красителей SYTO.

10 27. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру, представляет собой Hoechst 33342.

15 28. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, представляет собой агент для флуоресцентного мечения, специфичный к лейкоциту.

29. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный маркер лейкоцитов выбран из CD45, CD3, CD14, CD15, CD16 и/или CD19.

20 30. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный маркер лейкоцитов представляет собой CD45 и CD14.

31. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный маркер лейкоцитов представляет собой CD45.

25 32. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный генотип получают с помощью STR-анализа.

30 33. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный генотип получают с помощью SNP-анализа.

34. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный фенотип диагностируют путем обнаружения одного или более маркеров, связанных с генетической патологией, в геноме фетальной клетки.

35

35. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанную генетическую патологию выявляют одним или более способами, выбранными из сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (aCGH), анализа коротких tandemных повторов (STR-анализ), полногеномной амплификации, полногеномного сканирования, SNP чипа, полони-секвенирования, шотган-секвенирования, массивно-параллельного опознавательного секвенирования (MPSS), секвенирования по Сэнгеру, способов на основе ПЦР и способов секвенирования нового поколения.

36. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанные способы секвенирования нового поколения могут быть выбраны из группы, состоящей из секвенирования Illumina (Solexa), секвенирования Roche 454, ионного полупроводникового секвенирования Ion torrent: Proton/PGM, и/или секвенирования SOLiD.

37. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная генетическая патология представляет собой анеуплоидию, моносомию, полисомию, трисомию, вариацию числа копий (CNV), однонуклеотидную вариацию (SNV) или моногенное расстройство.

38. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный биологический образец содержит клеточную фракцию.

39. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная клеточная фракция содержит как материнские клетки, так и фетальные клетки.

40. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный биологический образец представляет собой образец крови.

41. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный образец крови имеет объем 5-30 мл.

42. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный образец крови представляет собой образец крови объемом 30 мл.

43. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный образец крови представляет собой образец крови объемом 10 мл.

44. Способ пренатальной диагностики, включающий стадии:

- 5 1. обеспечения образца крови от женщины, вынашивающей плод,
2. приведения клеток, содержащихся в указанном образце крови, в контакт с по меньшей мере одним агентом для мечения, специфичным к маркеру фетальных трофобластов,
- 10 3. обогащения указанного образца фетальными трофобластами с помощью микрофлюидного устройства,
4. приведения указанного образца в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения, выбранным из каждой из следующих групп:
 - i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,
 - 15 ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
 - iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов,
- 20 5. сортировки одиночных клеток для получения по меньшей мере одного фетального трофобласта из указанного обогащенного образца с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS) на основании:
 - i. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру фетальных трофобластов,
 - 25 ii. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к ядру, и
 - iii. отрицательного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру материнских клеток,
6. получения генотипа из указанного фетального трофобласта, и
- 30 7. диагностики фенотипа указанного плода.

Аспекты

1. Способ выделения фетальных клеток из биологического образца от беременной женщины, включающий стадии:

а. обеспечения биологического образца от указанной беременной женщины, содержащего клеточную фракцию,

б. приведения клеток, содержащихся в указанной клеточной фракции, в контакт с одним или более агентами для флуоресцентного мечения, специфичными к по меньшей мере одному эпителиальному маркеру и/или эндотелиальному маркеру фетальных клеток,

в. сортировки указанных клеток способом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), основанным на обнаружении указанных одного или более агентов для флуоресцентного мечения, связанных с клетками, и

г. идентификации фетальных клеток среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения.

2. Способ согласно любому из предшествующих элементов, где клеточную фракцию обогащают фетальными клетками перед проведением FACS.

3. Способ согласно аспекту 2, где обогащение включает обогащение клетками, экспрессирующими по меньшей мере один эндотелиальный маркер.

4. Способ согласно аспектам 2 или 3, где обогащение включает магнитно-активированную сортировку клеток.

5. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где FACS включает количественную оценку ряда параметров для каждой отсортированной клетки.

6. Способ согласно аспекту 5, где параметры представляют собой светорассеяние, такое как прямое и боковое светорассеяние; флуоресценцию ядерного красителя; флуоресценцию агента для флуоресцентного мечения, связанного с по меньшей мере одним фетальным маркером; и флуоресценцию агента для флуоресцентного мечения, связанного с по меньшей мере одним материнским маркером.

7. Способ согласно аспекту 6, где фетальный маркер представляет собой один или более эпителиальных маркеров, таких как один или более цитокератинов, и/или где

материнский маркер представляет собой маркер клеток крови, такой как CD14 и/или CD45.

5 8. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где дополнительным параметром является флуоресценция одного или более агентов для флуоресцентного мечения, специфичных к эндотелиальным маркерам, таким как CD105 и/или CD141.

10 9. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где классификация по признаку фетального происхождения представляет собой бинарную классификацию, определяющую клетку как фетальную или нефетальную.

15 10. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где классификация по признаку фетального происхождения представляет собой вероятность фетального происхождения.

20 11. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанная классификация по признаку фетального происхождения рассчитывают с использованием искусственного интеллекта, нейронной сети, ансамбля решающих деревьев, машинного обучения, регрессионного анализа или деревьев классификации с использованием набора для обучения, содержащего фетальные и материнские клетки.

12. Способ согласно аспекту 11, где регрессионный анализ представляет собой логистическую регрессию.

25 13. Способ согласно аспекту 12, где указанная логистическая регрессия включает постоянный параметр и конкретные значения определяемых параметров для расчета вероятности.

30 14. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанные отсортированные клетки представляют собой клетки, экспрессирующие по меньшей мере один эпителиальный маркер и/или эндотелиальный маркер, и не экспрессирующие по меньшей мере один клеточный маркер, специфичный для клеток крови.

35 15. Способ согласно аспекту 14, где клетки, положительные на по меньшей мере один эпителиальный маркер и отрицательные на или имеющие низкий уровень указанного

по меньшей мере одного маркера клеток крови, сортируют в резервуары, предпочтительно где каждый резервуар содержит только одну клетку.

5 16. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанный биологический образец представляет собой образец периферической крови или цервикальный мазок.

10 17. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где проводят отделение клеточной фракции от плазмы указанного образца периферической крови.

18. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанную клеточную фракцию отделяют от указанной плазменной фракции центрифугированием.

15 19. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанная клеточная фракция содержит эритроциты, лейкоциты и фетальные трофобласты, фетальные вневорсинчатые трофобласты и фетальные эндоваскулярные трофобласты.

20 20. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, дополнительно включающий стадию фиксации клеток крови после отделения от указанной плазменной фракции, где фиксация предпочтительно представляет собой фиксацию параформальдегидом.

25 21. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, дополнительно включающий стадию селективного лизиса эритроцитов указанной клеточной фракции с использованием поверхностно-активного вещества после отделения указанной клеточной фракции от указанной плазменной фракции, где указанный лизис также пермеабиллизует оставшиеся клетки в указанной клеточной фракции.

30 22. Способ согласно аспекту 1, где биологический образец представляет собой цервикальный мазок.

35 23. Способ согласно аспекту 22, где указанный цервикальный мазок подвергают воздействию уксусной кислоты или DDT для растворения слизи с последующей фиксацией, где фиксация предпочтительно представляет собой фиксацию параформальдегидом.

24. Способ согласно аспектам 22 и 23, где указанная клеточная фракция из цервикального мазка содержит фетальные клетки и клетки плоского эпителия, клетки столбчатого эпителия, лейкоциты и эритроциты.

5

25. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанные фетальные клетки представляют собой трофобласты, такие как цитотрофобласты и/или синцитиотрофобласты.

10

26. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанные выделенные фетальные клетки верифицируют как фетальные клетки по наличию фетального генотипа, отличающегося от материнского генотипа.

15

27. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где выделенные фетальные клетки подвергают полногеномной амплификации.

20

28. Способ согласно аспекту 26 или 27, где указанную верификацию проводят путем обнаружения коротких tandemных повторов или однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

25

29. Способ согласно аспекту 26 или 27, где 20 клеток с самой высокой вероятностью фетального происхождения подвергают полногеномной верификации и/или верифицируют как фетальные клетки, например, 15 клеток с самой высокой вероятностью, например, 10 клеток с самой высокой вероятностью, например, 7 клеток с самой высокой вероятностью, например, 5 клеток с самой высокой вероятностью, например, 3 клетки с самой высокой вероятностью.

30

30. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где способ обеспечивает идентификацию по меньшей мере 1 фетальной клетки в одном биологическом образце от одной беременной матери, где биологический образец содержит по меньшей мере 150 млн клеток, например, по меньшей мере 2 фетальных клетки, например, по меньшей мере 3 фетальных клетки.

35

31. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанный по меньшей мере один эпителиальный маркер выбран из группы, состоящей из

человеческого цитокератина 1 СК1, человеческого цитокератина 2 СК2, человеческого цитокератина 3 СК3, человеческого цитокератина 4 СК4, человеческого цитокератина 5 СК5, человеческого цитокератина 6 СК6, человеческого цитокератина 7 СК7, человеческого цитокератина 8 СК8, человеческого цитокератина 10 СК10, человеческого цитокератина 13 СК13, человеческого цитокератина 14 СК14, человеческого цитокератина 15 СК15, человеческого цитокератина 16 СК16, человеческого цитокератина 17 СК17, человеческого цитокератина 18 СК18, человеческого цитокератина 19 СК19.

32. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанный по меньшей мере один эпителиальный маркер представляет собой СК7, СК18 или их комбинацию.

33. Способ согласно аспекту 31 или 32, где антитела к эпителиальным маркерам связаны с одним и тем же флуорофором.

34. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанный по меньшей мере один эндотелиальный маркер выбран из группы, состоящей из тромбомодулина CD141, человеческого эндоглина CD105, человеческого виментина Vim, молекулы адгезии сосудистого эндотелия VCAM, молекулы межклеточной адгезии-1 ICAM, рецептора фактора роста эндотелия сосудов-1 (Flt-1) VEGFR-1, рецептора фактора роста эндотелия сосудов-2 VEGFR-2, рецептора фактора роста эндотелия сосудов-3 VEGFR-3, ингибитора активатора плазминогена-1 PAI-1, эндотелиального рецептора протеина С EPCR.

35. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанный по меньшей мере один эндотелиальный маркер представляет собой CD105, CD141 или их комбинацию.

36. Способ согласно аспекту 34 или 35, где антитела к эндотелиальным маркерам мечены одним и тем же флуорофором.

37. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанный по меньшей мере один клеточный маркер, специфичный для клеток крови, представляет

собой CD14 и/или CD45, предпочтительно где антитела к разным маркерам клеток крови мечены одним и тем же флуорофором.

5 38. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанные идентифицированные фетальные клетки экспрессируют указанный по меньшей мере один эпителиальный маркер и/или эндотелиальный маркер, и не экспрессируют указанный по меньшей мере один клеточный маркер, специфичный для клеток крови.

10 39. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанный по меньшей мере один флуоресцентный ядерный краситель представляет собой ДНК-интеркалирующий краситель, например, любой краситель Hoechst, DAPI, пропидий йодид, 7-AAD, краситель Vybrant DyeCycle Ruby.

15 40. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где указанные один или более агентов для флуоресцентного мечения непосредственно или опосредованно мечены по меньшей мере одним флуорофором.

20 41. Способ согласно аспекту 40, где указанный флуорофор выбран из группы, состоящей из Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, флуоресцеина изотиоцианата (FITC), фикоэритрина (PE) и BV421.

42. Способ согласно аспекту 40, где указанные агенты для флуоресцентного мечения опосредованно мечены агентом для вторичного мечения.

25 43. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, где агенты для флуоресцентного мечения представляют собой антитела, нуклеотидные зонды, рецепторные лиганды или другие специфически связывающиеся молекулы.

30 44. Способ согласно аспекту 43, где нуклеотидный зонд представляет собой РНК-, ДНК- или LNA-зонд.

35 45. Способ согласно любому из предшествующих аспектов, дополнительно включающий стадию обнаружения одного или более генетических маркеров, связанных с генетической патологией, в геноме указанных выделенных фетальных клеток.

46. Способ согласно аспекту 45, где указанные один или более генетических маркеров связаны с анеуплоидией, моносомией, полисомией, трисомией, вариацией числа копий (CNV), однонуклеотидной вариацией (SNV) или моногенным расстройством.

5 47. Способ определения генетической патологии у плода, включающий стадии:

a. получения одной или более фетальных клеток, выделенных способом, как определено в любом из предшествующих аспектов 1-46, и

b. обнаружения одного или более генетических маркеров, связанных с указанной генетической патологией, в геноме указанной фетальной клетки.

10

48. Способ согласно аспекту 47, где указанные один или более генетических маркеров обнаруживают одним или более способами, выбранными из группы, состоящей из сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (aCGH), анализа коротких tandemных повторов (STR-анализ), полногеномной амплификации, полногеномного сканирования, полони-секвенирования, шотган-секвенирования, массивно-параллельного опознавательного секвенирования (MPSS), секвенирования по Сэнгеру, способов на основе ПЦР и способов секвенирования нового поколения.

15

49. Способ согласно аспекту 48, где указанные способы секвенирования нового поколения могут быть выбраны из группы, состоящей из секвенирования Illumina (Solexa), секвенирования Roche 454, ионного полупроводникового секвенирования Ion torrent: Proton/PGM, и/или секвенирования SOLiD.

20

50. Способ согласно аспекту 47, где указанная генетическая патология представляет собой анеуплоидию, моносомию, полисомию, трисомию, вариацию числа копий (CNV), однонуклеотидную вариацию (SNV) или моногенное расстройство.

25

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ пренатальной диагностики, включающий стадии:

- 1) обеспечения образца крови от женщины, вынашивающей плод,
- 2) приведения клеток, содержащихся в указанном образце крови, в контакт с по меньшей мере одним агентом для магнитного мечения, специфичным к маркеру фетальных трофобластов,
- 3) обогащения указанного образца фетальными трофобластами с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS),
- 4) приведения обогащенных клеток в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения, выбранным из каждой из следующих групп:
 - i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,
 - ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
 - iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов,
- 5) сортировки одиночных клеток путем сортировки флуоресцентно меченых клеток с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS) из указанного обогащенного образца на основании:
 - i. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру фетальных трофобластов,
 - ii. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к ядру, и
 - iii. отрицательного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру материнских клеток,
- 6) идентификации фетальных трофобластов среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения путем получения генотипа из одиночных отсортированных клеток, и
- 7) диагностики фенотипа указанного плода.

2. Способ пренатальной диагностики, включающий стадии:

- 1) обеспечения образца крови от женщины, вынашивающей плод,
- 2) приведения клеток, содержащихся в указанном образце крови, в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения, выбранным из каждой из следующих групп:

- i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,
 - ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
 - iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов,
- 3) обогащения указанного образца фетальными трофобластами с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS) на основании флуоресценции указанных агентов для флуоресцентного мечения,
- 4) сортировки одиночных клеток путем сортировки флуоресцентно меченых клеток с помощью FACS из указанного обогащенного образца на основании:
- i. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру фетальных трофобластов,
 - ii. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к ядру, и
 - iii. отрицательного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру материнских клеток,
- 5) идентификации трофобластов среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения путем получения генотипа из указанного фетального трофобласта, и
- 6) диагностики фенотипа указанного плода.

3. Способ по п. 1 или 2, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эндотелиальному или эпителиальному маркеру.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эндотелиальному маркеру.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где указанный эндотелиальный маркер выбран из Thy-1 CD90, тромбомодулина CD141, человеческого эндоглина CD105, человеческого виментина (Vim), молекулы адгезии сосудистого эндотелия (VCAM), молекулы

межклеточной адгезии-1 (ICAM), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-1 (Flt-1) (VEGFR-1), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGFR-2), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-3 (VEGFR-3), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), эндотелиального рецептора протеина С (EPCR), CD146, ITGA5, ITGB5, CDH11, CDH3 и/или CD59.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где указанный эндотелиальный маркер представляет собой CD105, CD90 и/или CD141.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где указанный эндотелиальный маркер представляет собой CD105 и/или CD141.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эпителиальному маркеру.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин, такой как человеческий цитокератин 1 СК1, человеческий цитокератин 2 СК2, человеческий цитокератин 3 СК3, человеческий цитокератин 4 СК4, человеческий цитокератин 5 СК5, человеческий цитокератин 6 СК6, человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 9 СК9, человеческий цитокератин 10 СК10, человеческий цитокератин 13 СК13, человеческий цитокератин 14 СК14, человеческий цитокератин 15 СК15, человеческий цитокератин 16 СК16, человеческий цитокератин 17 СК17, человеческий цитокератин 18 СК18, человеческий цитокератин 19 СК19.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин, человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 18 СК18 и/или человеческий цитокератин 19 СК19.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где указанный эпителиальный маркер представляет собой человеческий цитокератин 7 CK7, человеческий цитокератин 8 CK8, человеческий цитокератин 18 CK18 и/или человеческий цитокератин 19 CK19.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где указанные агенты для флуоресцентного мечения представляют собой антитела, нуклеотидные зонды, рецепторные лиганды и/или другие специфически связывающиеся молекулы.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где указанный по меньшей мере один агент для флуоресцентного мечения непосредственно мечен по меньшей мере одним флуорофором.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где указанный по меньшей мере один агент для флуоресцентного мечения опосредованно мечен по меньшей мере одним флуорофором.

16. Способ по п. 14 и п. 15, где указанный флуорофор выбран из группы, состоящей из Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, флуоресцеина изотиоцианата (FITC), фикоэритрина (PE) и BV421.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру, выбран из любого красителя Hoechst, DAPI, пропидий йодида, 7-AAD, красителей Vybrant DyeCycle, красителей SYTOX или красителей SYTO.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру, представляет собой Hoechst 33342.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, представляет собой агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру лейкоцитов.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где указанный маркер лейкоцитов выбран из CD45, CD3, CD14, CD15, CD16 и/или CD19.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где указанный маркер лейкоцитов представляет собой CD45 и CD14.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где указанный маркер лейкоцитов представляет собой CD45.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где указанный генотип получают с помощью STR-анализа (анализ коротких tandemных повторов).

24. Способ по любому из пп. 1-23, где указанный генотип получают с помощью SNP-анализа (анализ однонуклеотидных полиморфизмов).

25. Способ по любому из пп. 1-24, где указанный фенотип диагностируют путем обнаружения одного или более маркеров, связанных с генетической патологией, в геноме фетальной клетки.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где указанную генетическую патологию выявляют одним или более методами, выбранными из сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (aCGH), анализа коротких tandemных повторов (STR-анализ), полногеномной амплификации, полногеномного сканирования, SNP чипа, полони-секвенирования, шотган-секвенирования, массивно-параллельного опознавательного секвенирования (MPSS), секвенирования по Сэнгеру, методов на основе ПЦР и методов секвенирования нового поколения.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где указанные методы секвенирования нового поколения могут быть выбраны из группы, состоящей из секвенирования Illumina (Solexa), секвенирования Roche 454, ионного полупроводникового секвенирования Ion torrent: Proton/PGM, и/или секвенирования SOLiD.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где указанная генетическая патология представляет собой анеуплоидию, моносомию, полисомию, трисомию, вариацию числа копий (CNV), однонуклеотидную вариацию (SNV) или моногенное расстройство.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где указанный образец крови имеет объем 5-30 мл.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где указанный образец крови представляет собой образец крови объемом 30 мл.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где указанный образец крови представляет собой образец крови объемом 10 мл.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где указанный образец крови содержит клеточную фракцию.

33. Способ по любому из пп. 1-32, где проводят отделение клеточной фракции от плазмы указанного образца крови.

34. Способ по любому из пп. 1-33, где указанную клеточную фракцию отделяют от указанной плазменной фракции центрифугированием.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где указанная клеточная фракция содержит как материнские клетки, так и фетальные клетки.

36. Способ по любому из пп. 1-35, где указанная клеточная фракция содержит эритроциты, лейкоциты и фетальные трофобласты, фетальные вневорсинчатые трофобласты и фетальные эндоваскулярные трофобласты.

37. Способ по любому из пп. 1-36, дополнительно включающий стадию фиксации клеток крови после отделения от указанной плазменной фракции, где фиксация предпочтительно представляет собой фиксацию параформальдегидом.

38. Способ по любому из пп. 1-37, дополнительно включающий стадию селективного лизиса эритроцитов указанной клеточной фракции с использованием поверхностно-активного вещества после отделения указанной клеточной фракции от указанной плазменной фракции, где указанный лизис также пермеабиллизует оставшиеся клетки в указанной клеточной фракции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

с изменениями по ст. 34 РСТ

1. Способ пренатальной диагностики, включающий стадии:

- 1) обеспечения образца крови от женщины, вынашивающей плод,
- 2) приведения клеток, содержащихся в указанном образце крови, в контакт с по меньшей мере одним агентом для магнитного мечения, специфичным к маркеру фетальных трофобластов,
- 3) обогащения указанного образца фетальными трофобластами с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS),
- 4) после стадии обогащения выполняют сортировку одиночных клеток с помощью FACS (сортировщик клеток с активированной флуоресценцией) путем приведения обогащенных клеток в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения, выбранным из каждой из следующих групп:
 - i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,
 - ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
 - iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов,
- 5) сортировки одиночных клеток путем сортировки флуоресцентно меченых клеток с помощью FACS из указанного обогащенного образца на основании:
 - i. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру фетальных трофобластов,
 - ii. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к ядру, и
 - iii. отрицательного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру материнских клеток,
- 6) идентификации фетальных трофобластов среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения путем получения генотипа из одиночных отсортированных клеток, и
- 7) диагностики фенотипа указанного плода.

2. Способ пренатальной диагностики, включающий стадии:

- 1) обеспечения образца крови от женщины, вынашивающей плод,
- 2) приведения клеток, содержащихся в указанном образце крови, в контакт с по меньшей мере одним агентом для флуоресцентного мечения, выбранным из каждой из следующих групп:
 - i. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру,
 - ii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, и
 - iii. агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов,
- 3) обогащения указанного образца фетальными трофобластами с помощью сортировщика клеток с активированной флуоресценцией (FACS) на основании флуоресценции указанных агентов для флуоресцентного мечения,
- 4) после стадии обогащения выполняют сортировку одиночных клеток с помощью FACS путем сортировки одиночных клеток путем сортировки флуоресцентно меченых клеток с помощью FACS из указанного обогащенного образца на основании:
 - i. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру фетальных трофобластов,
 - ii. положительного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к ядру, и
 - iii. отрицательного отбора по указанному агенту для флуоресцентного мечения, специфичному к маркеру материнских клеток,
- 5) идентификации трофобластов среди указанных отсортированных клеток, включающей стадию классификации индивидуально отсортированных клеток по признаку фетального происхождения путем получения генотипа из указанного фетального трофобласта, и
- 6) диагностики фенотипа указанного плода.

3. Способ по п. 1 или 2, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эндотелиальному или эпителиальному маркеру.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эндотелиальному маркеру.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где указанный эндотелиальный маркер выбран из Thy-1 CD90, тромбомодулина CD141, человеческого эндоглина CD105, человеческого виментина (Vim), молекулы адгезии сосудистого эндотелия (VCAM), молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-1 (Flt-1) (VEGFR-1), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGFR-2), рецептора фактора роста эндотелия сосудов-3 (VEGFR-3), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), эндотелиального рецептора протеина C (EPCR), CD146, ITGA5, ITGB5, CDH11, CDH3 и/или CD59.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где указанный эндотелиальный маркер представляет собой CD105, CD90 и/или CD141.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где указанный эндотелиальный маркер представляет собой CD105 и/или CD141.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где указанный агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру фетальных трофобластов, представляет собой агент для магнитного и/или флуоресцентного мечения, специфичный к эпителиальному маркеру.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин, такой как человеческий цитокератин 1 СК1, человеческий цитокератин 2 СК2, человеческий цитокератин 3 СК3, человеческий цитокератин 4 СК4, человеческий цитокератин 5 СК5, человеческий цитокератин 6 СК6, человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 9 СК9, человеческий цитокератин 10 СК10, человеческий цитокератин 13 СК13, человеческий цитокератин 14 СК14, человеческий цитокератин 15 СК15,

человеческий цитокератин 16 СК16, человеческий цитокератин 17 СК17, человеческий цитокератин 18 СК18, человеческий цитокератин 19 СК19.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где указанный эпителиальный маркер представляет собой цитокератин, человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 18 СК18 и/или человеческий цитокератин 19 СК19.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где указанный эпителиальный маркер представляет собой человеческий цитокератин 7 СК7, человеческий цитокератин 8 СК8, человеческий цитокератин 18 СК18 и/или человеческий цитокератин 19 СК19.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где указанные агенты для флуоресцентного мечения представляют собой антитела, нуклеотидные зонды, рецепторные лиганды и/или другие специфически связывающиеся молекулы.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где указанный по меньшей мере один агент для флуоресцентного мечения непосредственно мечен по меньшей мере одним флуорофором.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где указанный по меньшей мере один агент для флуоресцентного мечения опосредованно мечен по меньшей мере одним флуорофором.

16. Способ по п. 14 и п. 15, где указанный флуорофор выбран из группы, состоящей из Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, флуоресцеина изотиоцианата (FITC), фикоэритрина (PE) и BV421.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру, выбран из любого красителя Hoechst, DAPI, пропидий йодида, 7-AAD, красителей Vybrant DyeCycle, красителей SYTOX или красителей SYTO.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к ядру, представляет собой Hoechst 33342.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где указанный агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру материнских клеток, представляет собой агент для флуоресцентного мечения, специфичный к маркеру лейкоцитов.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где указанный маркер лейкоцитов выбран из CD45, CD3, CD14, CD15, CD16 и/или CD19.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где указанный маркер лейкоцитов представляет собой CD45 и CD14.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где указанный маркер лейкоцитов представляет собой CD45.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где указанный генотип получают с помощью STR-анализа (анализ коротких tandemных повторов).

24. Способ по любому из пп. 1-23, где указанный генотип получают с помощью SNP-анализа (анализ однонуклеотидных полиморфизмов).

25. Способ по любому из пп. 1-24, где указанный фенотип диагностируют путем обнаружения одного или более маркеров, связанных с генетической патологией, в геноме фетальной клетки.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где указанную генетическую патологию выявляют одним или более методами, выбранными из сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (aCGH), анализа коротких tandemных повторов (STR-анализ), полногеномной амплификации, полногеномного сканирования, SNP чипа, полони-секвенирования, шотган-секвенирования, массивно-параллельного опознавательного секвенирования (MPSS), секвенирования по Сэнгеру, методов на основе ПЦР и методов секвенирования нового поколения.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где указанные методы секвенирования нового поколения могут быть выбраны из группы, состоящей из секвенирования Illumina (Solexa), секвенирования Roche 454, ионного полупроводникового секвенирования Ion torrent: Proton/PGM, и/или секвенирования SOLiD.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где указанная генетическая патология представляет собой анеуплоидию, моносомию, полисомию, трисомию, вариацию числа копий (CNV), однонуклеотидную вариацию (SNV) или моногенное расстройство.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где указанный образец крови имеет объем 5-30 мл.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где указанный образец крови представляет собой образец крови объемом 30 мл.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где указанный образец крови представляет собой образец крови объемом 10 мл.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где указанный образец крови содержит клеточную фракцию.

33. Способ по любому из пп. 1-32, где проводят отделение клеточной фракции от плазмы указанного образца крови.

34. Способ по любому из пп. 1-33, где указанную клеточную фракцию отделяют от указанной плазменной фракции центрифугированием.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где указанная клеточная фракция содержит как материнские клетки, так и фетальные клетки.

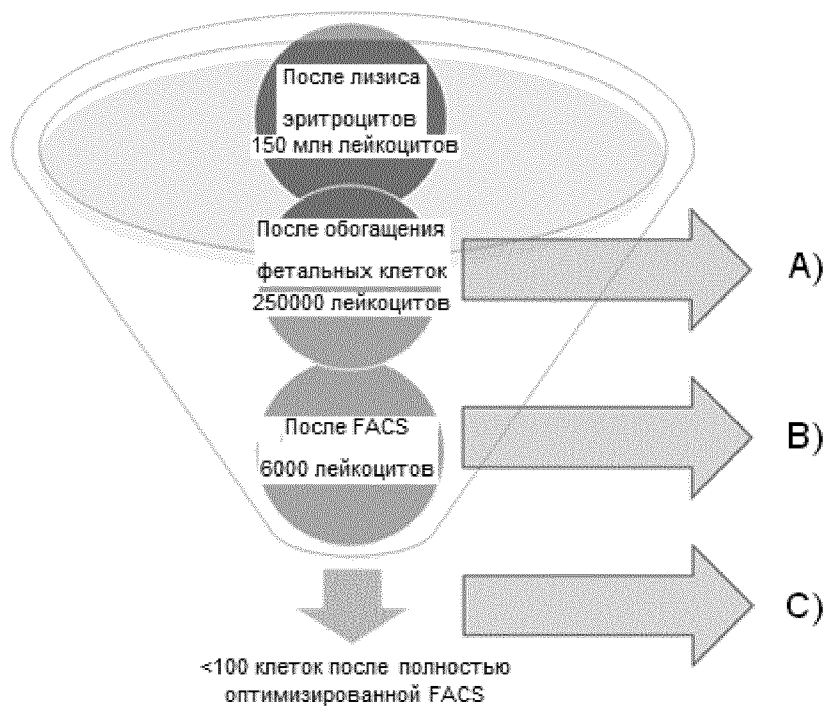
36. Способ по любому из пп. 1-35, где указанная клеточная фракция содержит эритроциты, лейкоциты и фетальные трофобласты, фетальные вневорсинчатые трофобласты и фетальные эндоваскулярные трофобласты.

37. Способ по любому из пп. 1-36, дополнительно включающий стадию фиксации клеток крови после отделения от указанной плазменной фракции, где фиксация предпочтительно представляет собой фиксацию параформальдегидом.

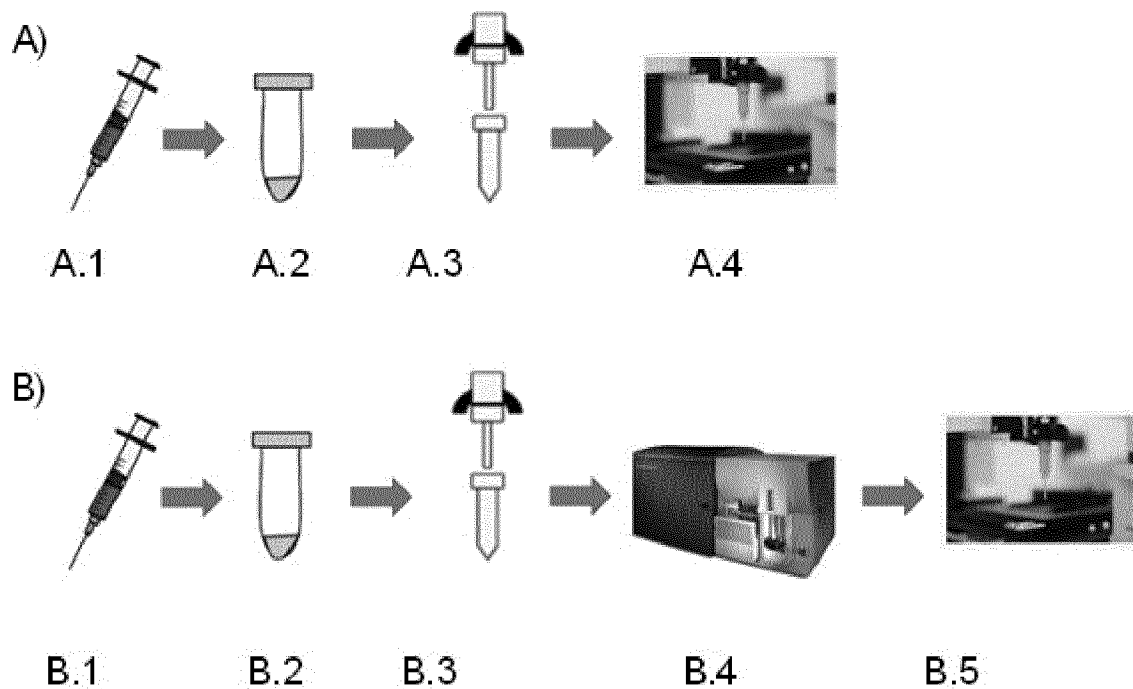
38. Способ по любому из пп. 1-37, дополнительно включающий стадию селективного лизиса эритроцитов указанной клеточной фракции с использованием поверхностно-активного вещества после отделения указанной клеточной фракции от указанной плазменной фракции, где указанный лизис также пермеабилизует оставшиеся клетки в указанной клеточной фракции.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ FACS

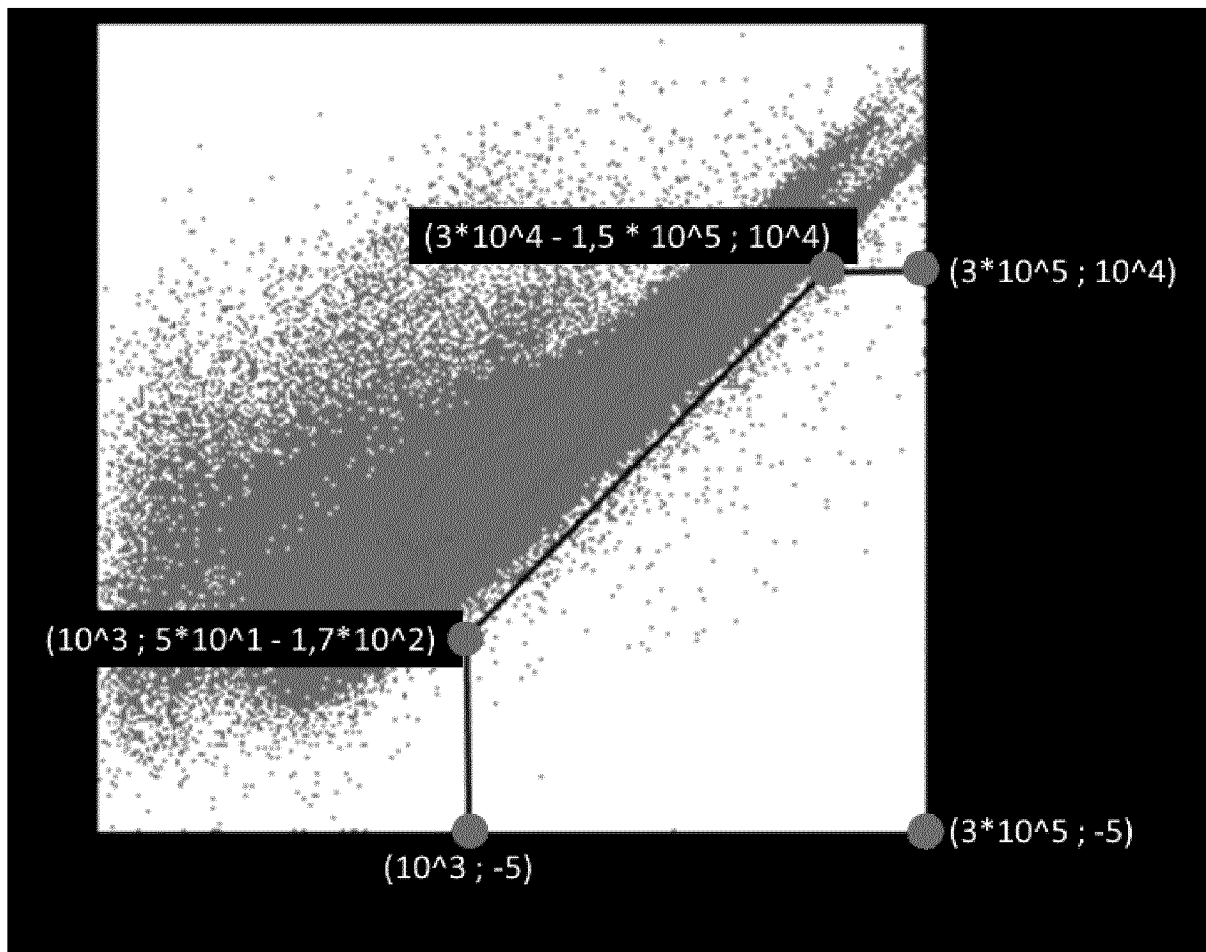
Фиг. 1



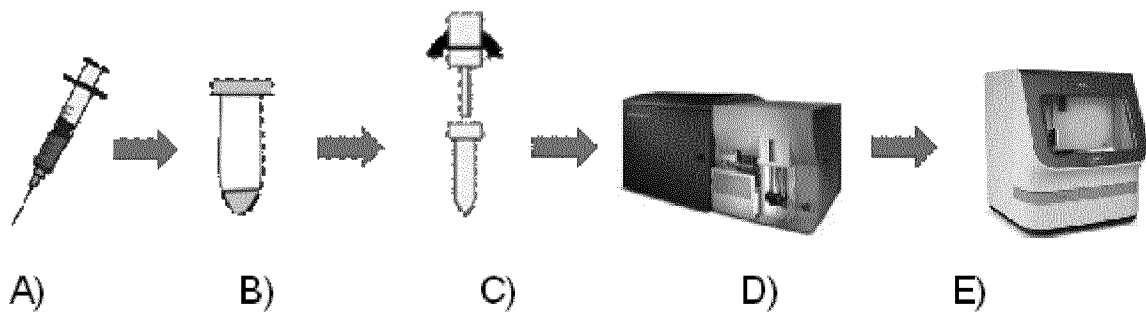
Фиг. 2



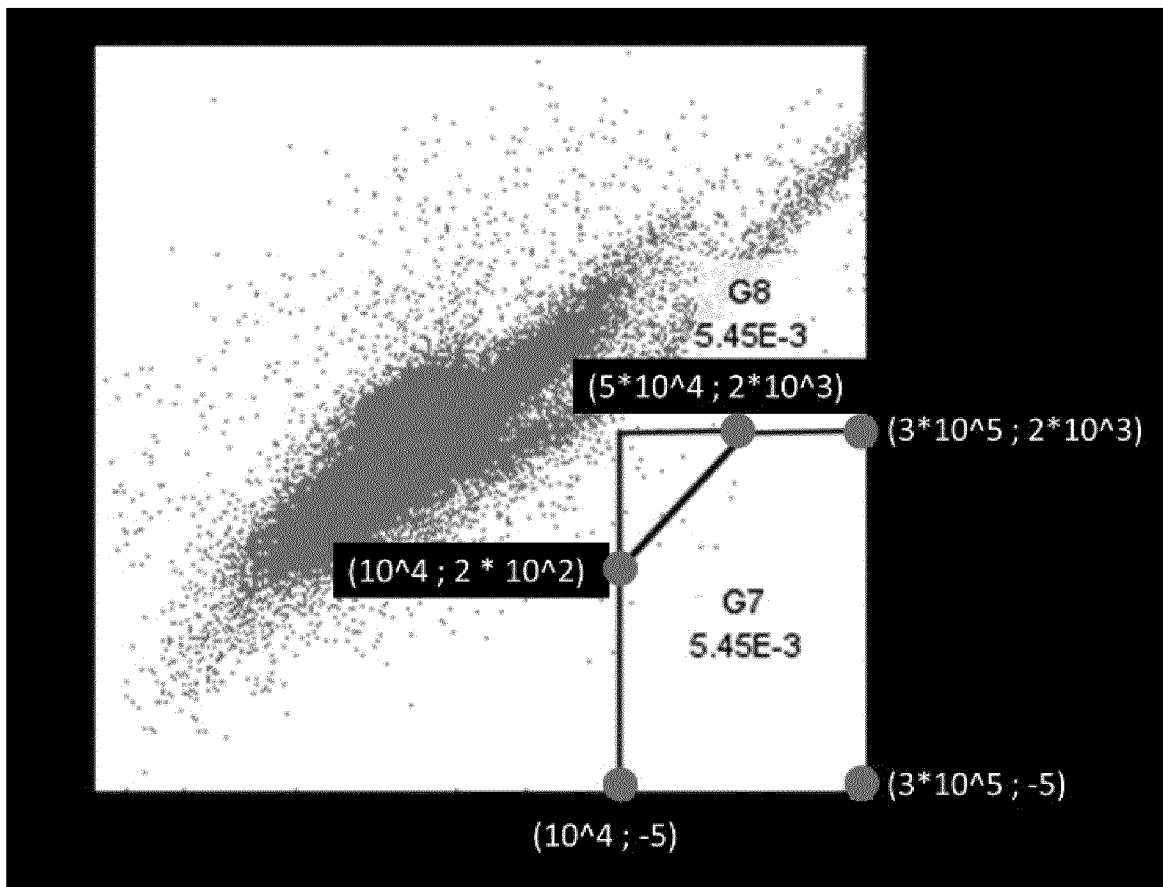
Фиг. 3



Фиг. 4

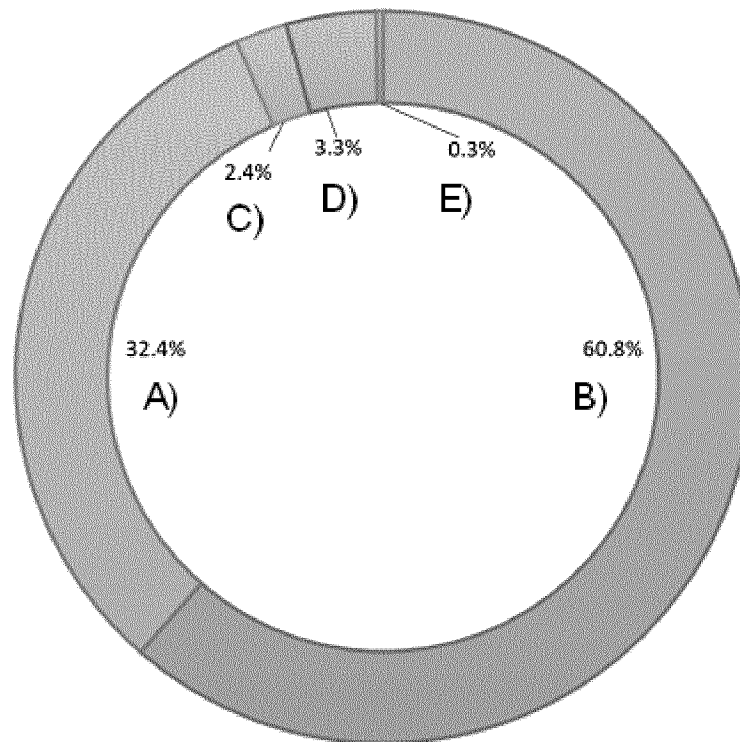


Фиг. 5

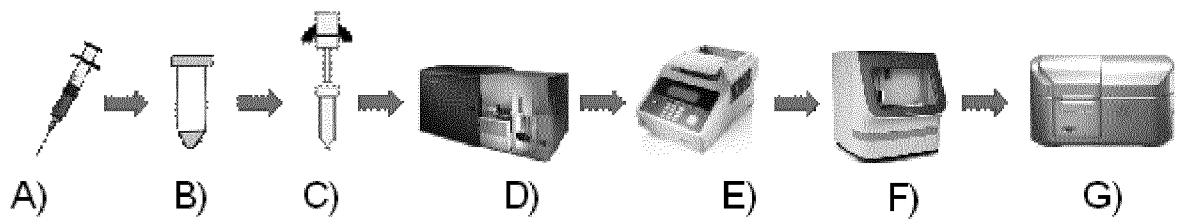


ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ FACS

Фиг. 6

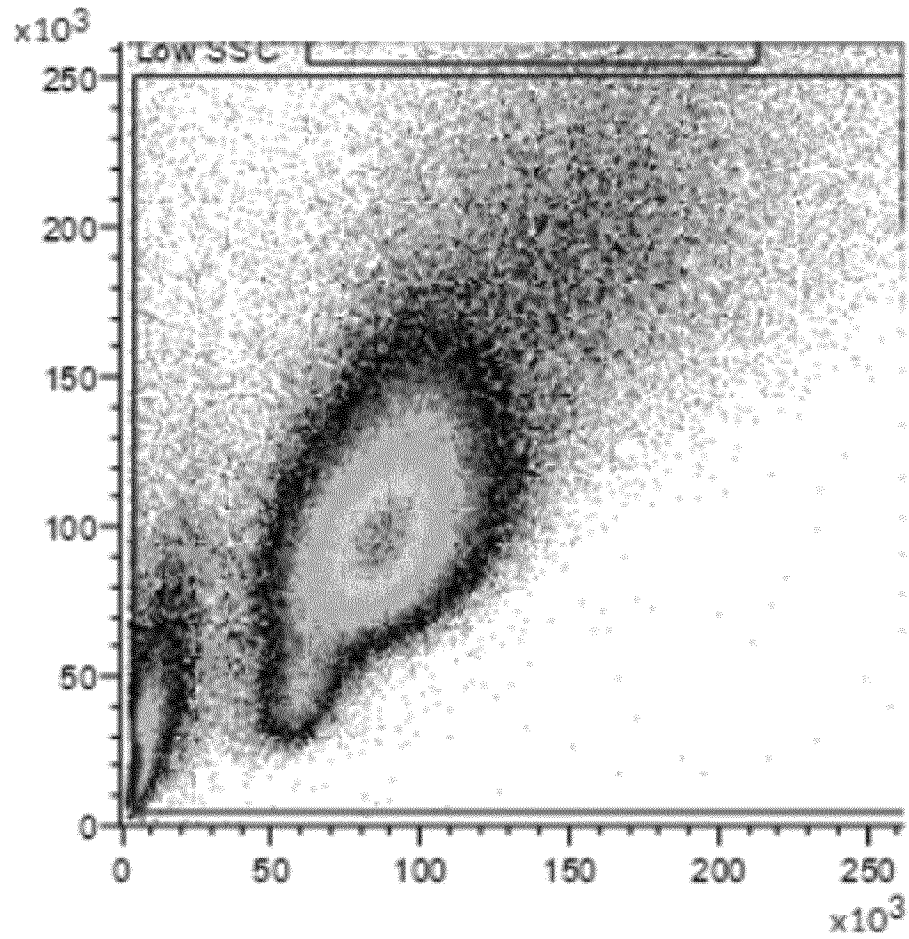


Фиг. 7

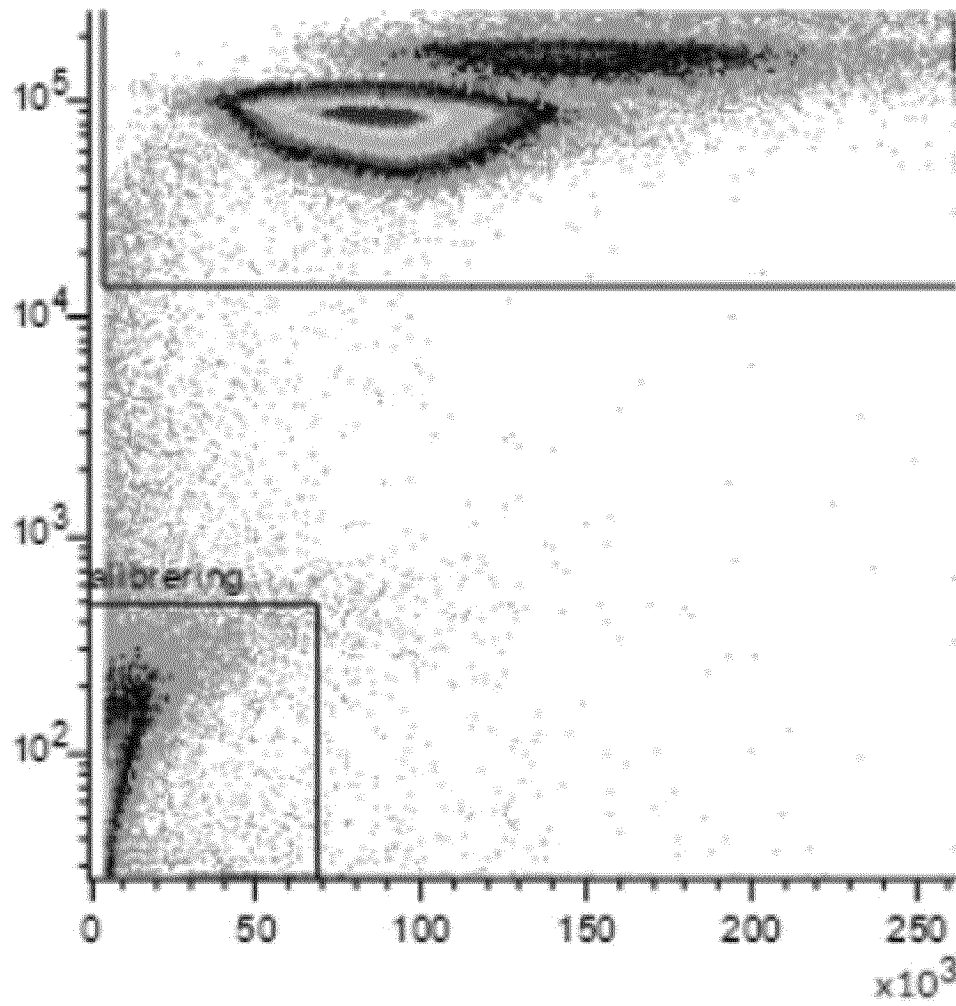


Фиг. 8

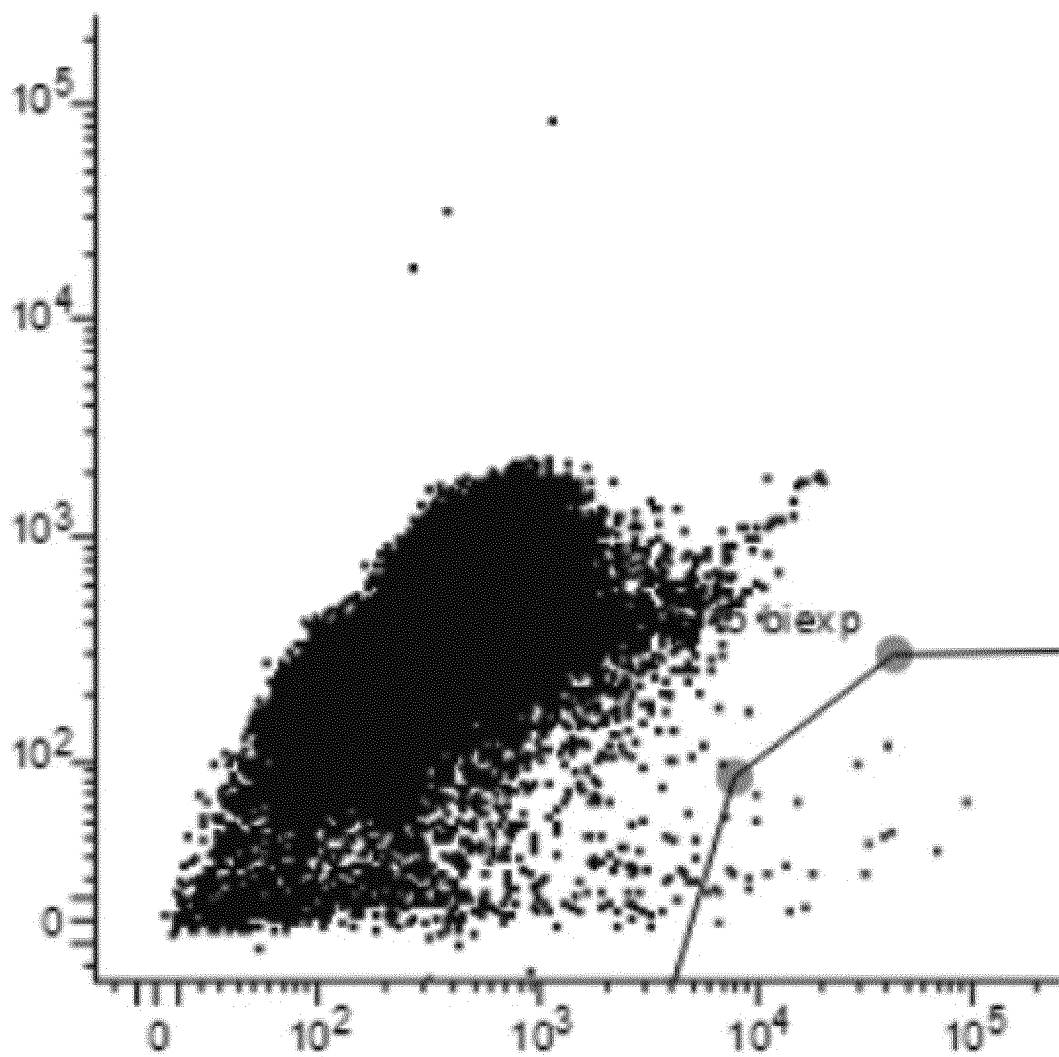
А)



В)

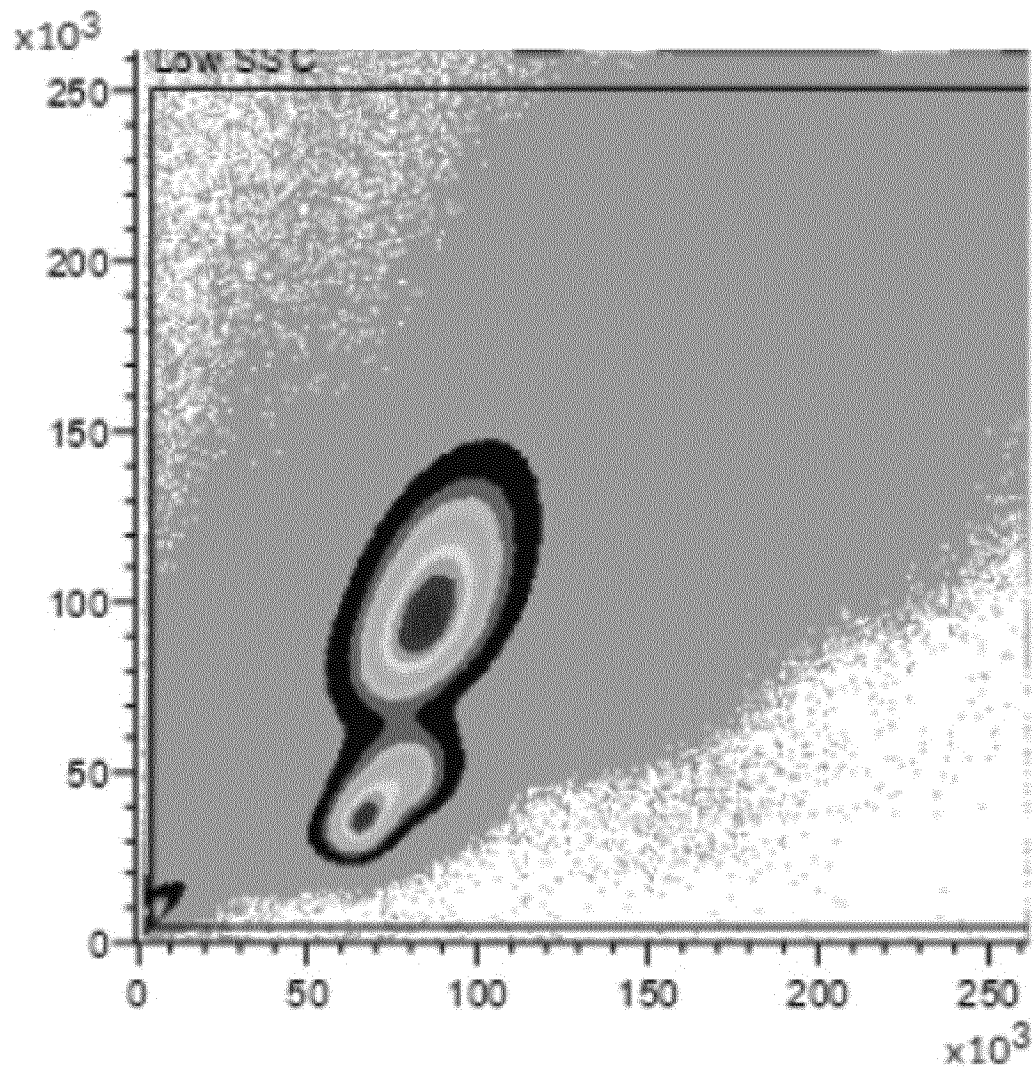


С)

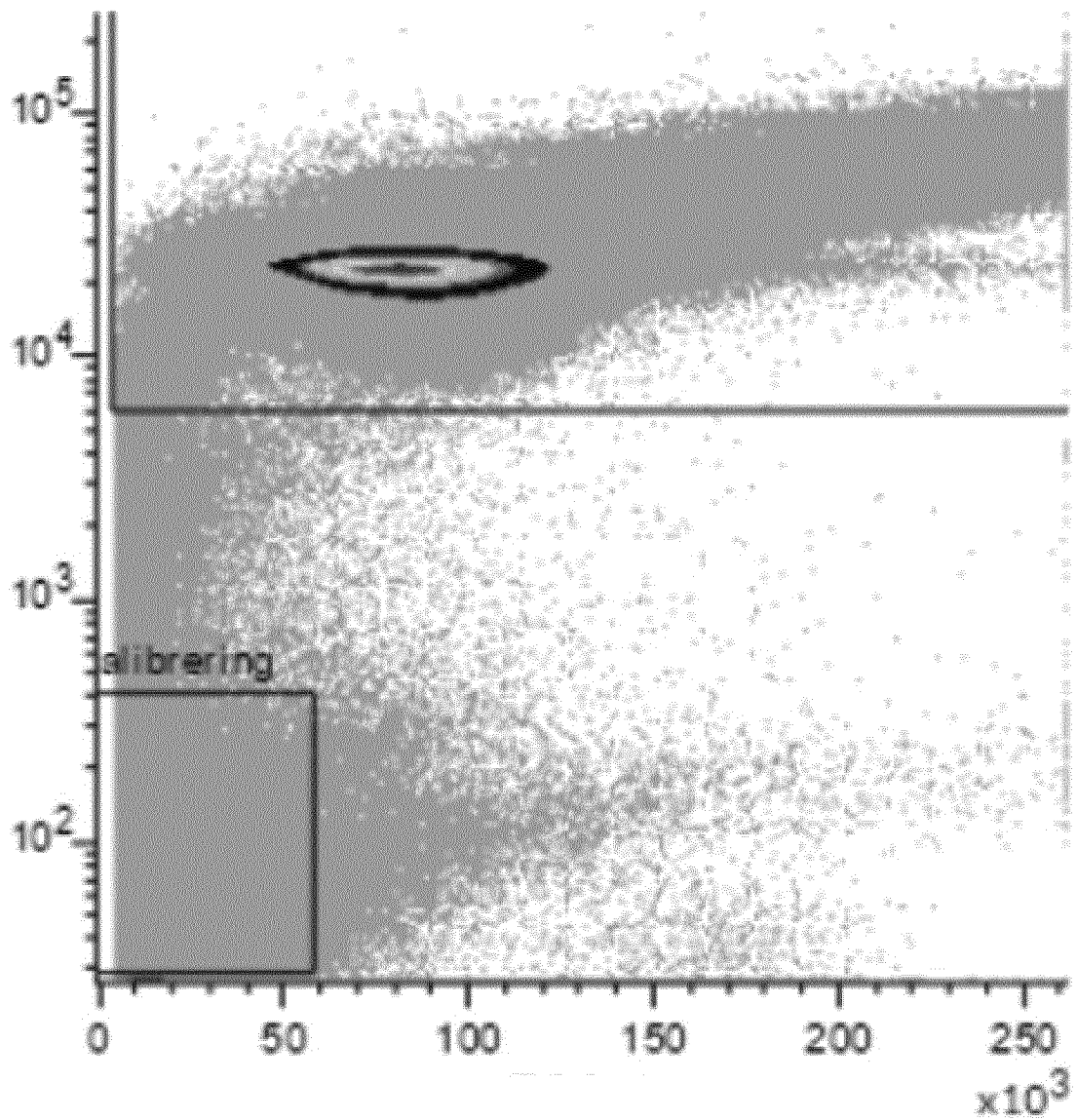


Фиг. 9

А)

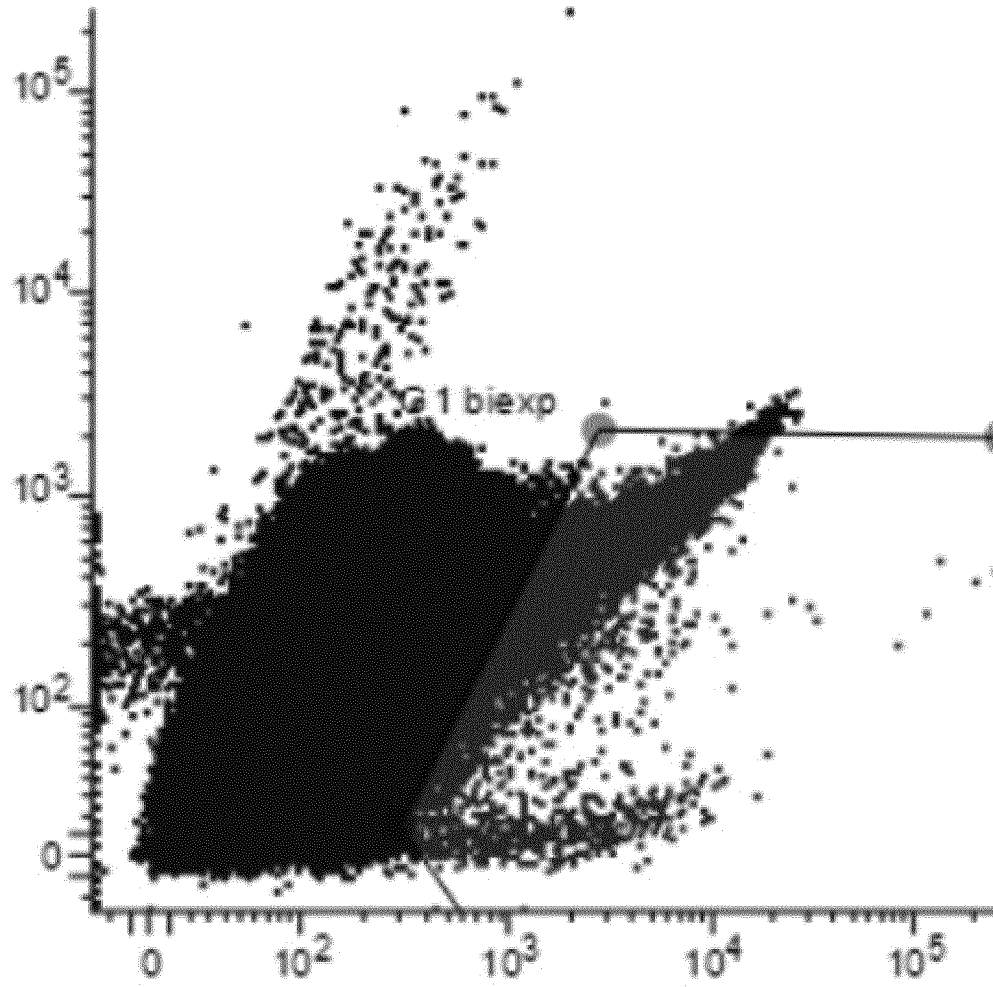


В)



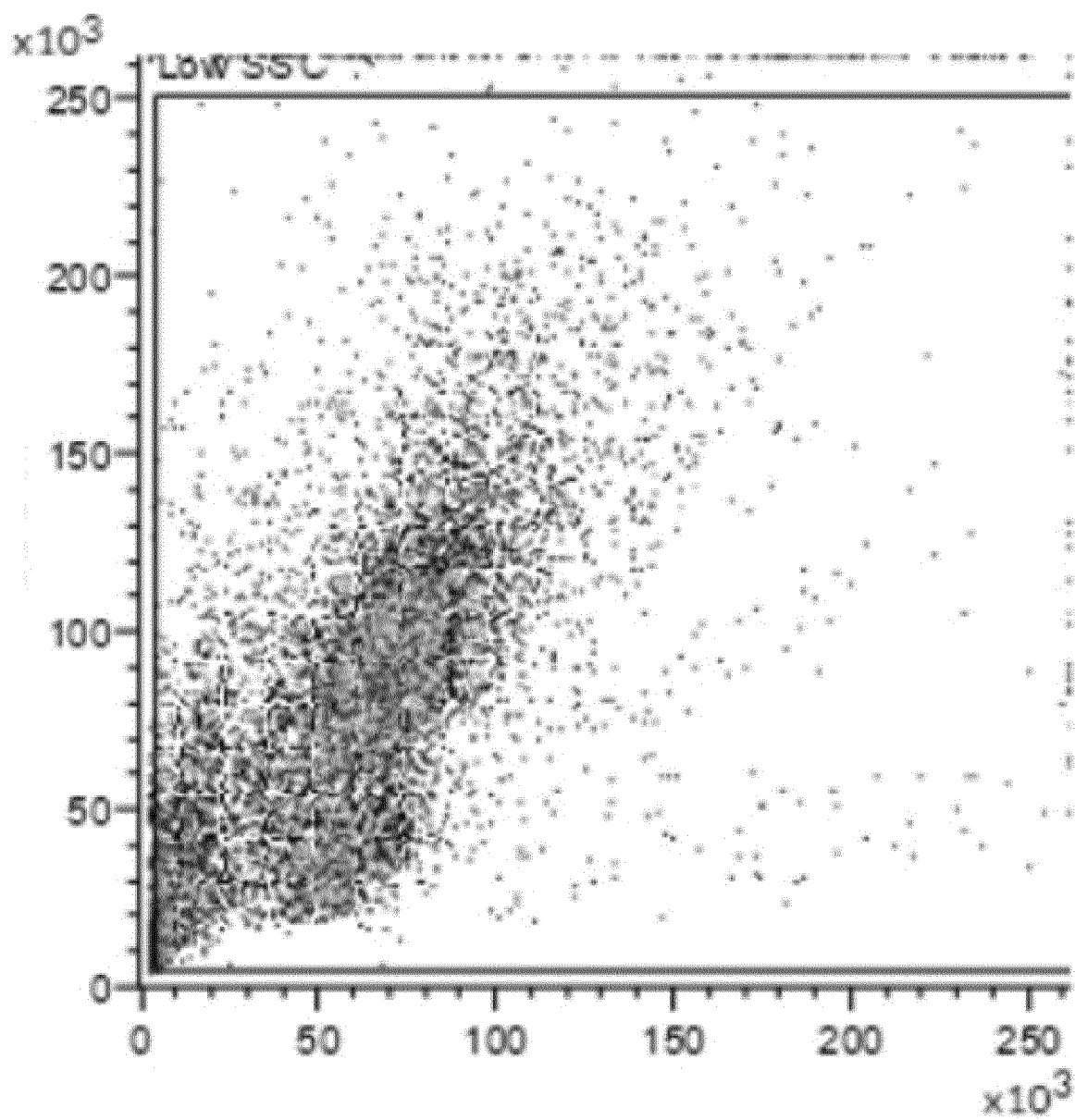
ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ FACS

С)

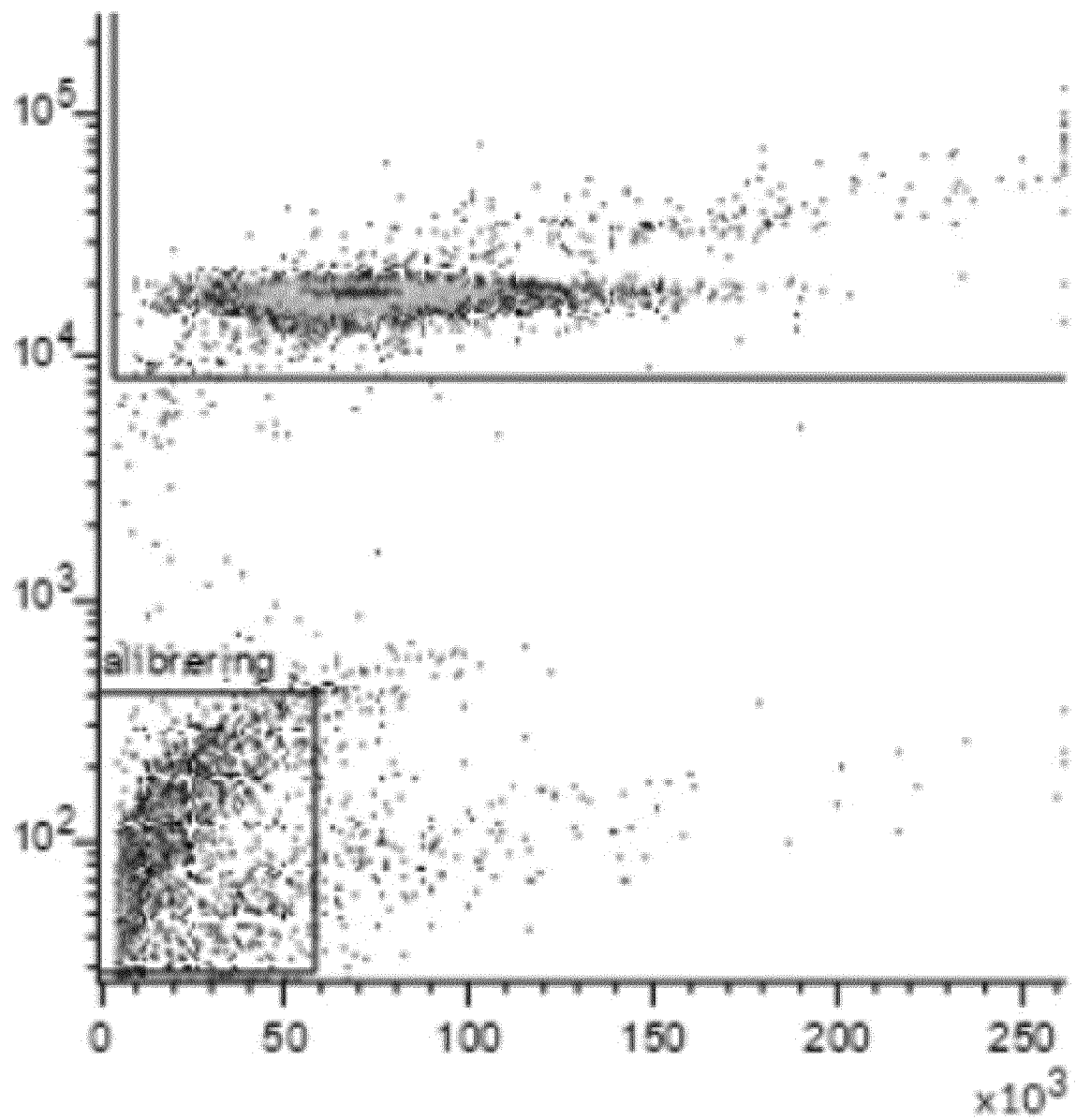


Фиг. 10

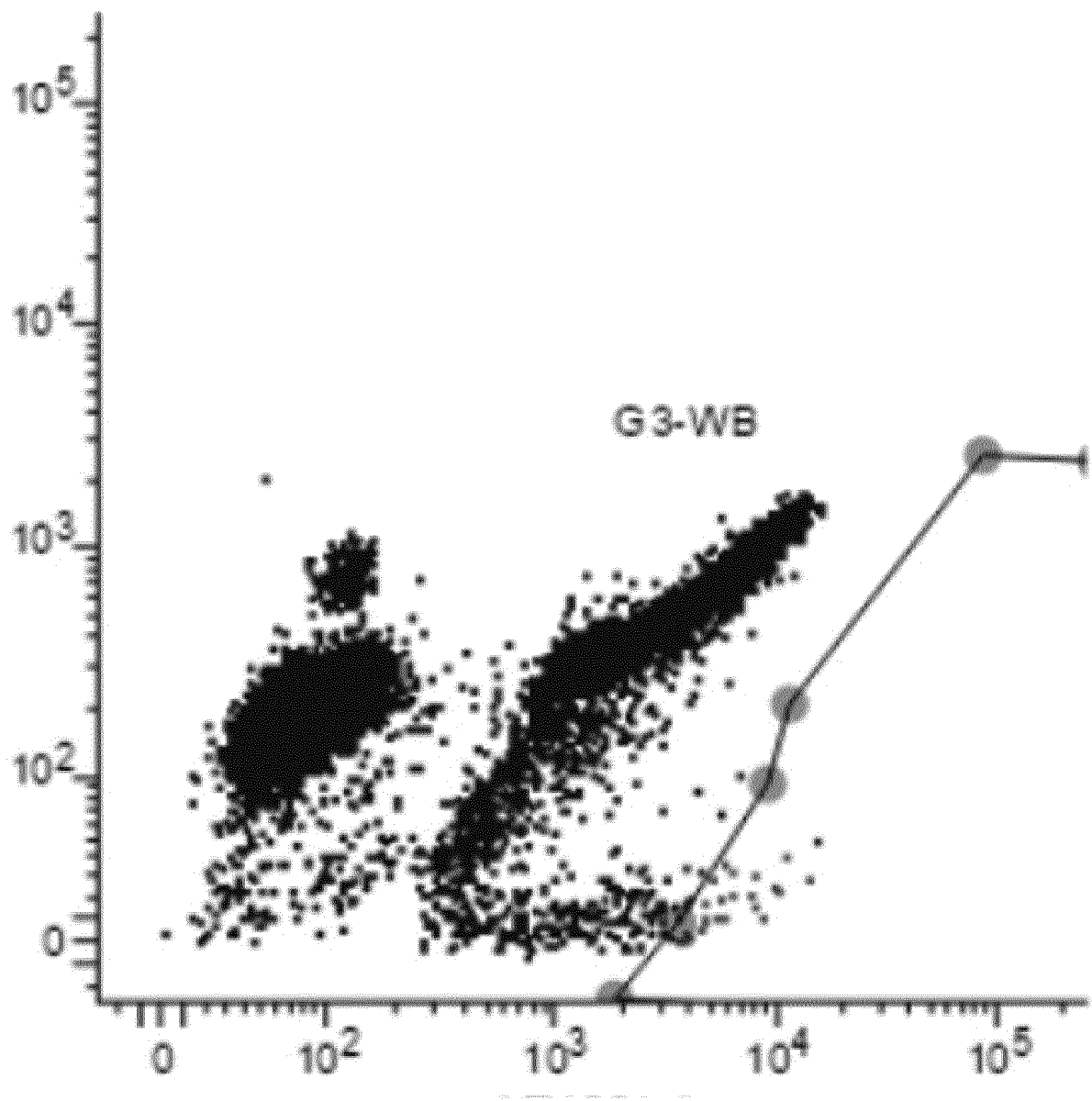
А)



В)

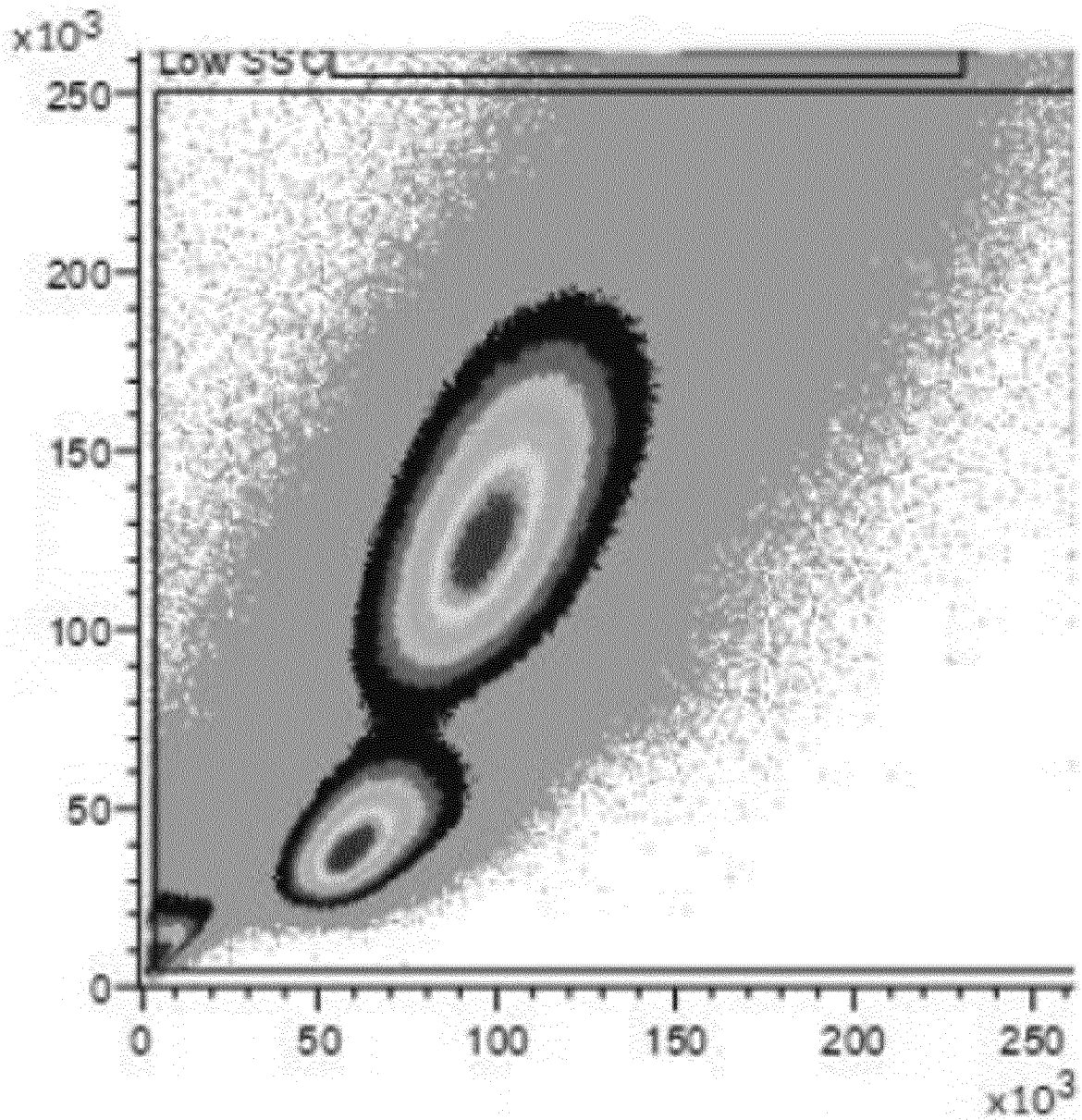


С)

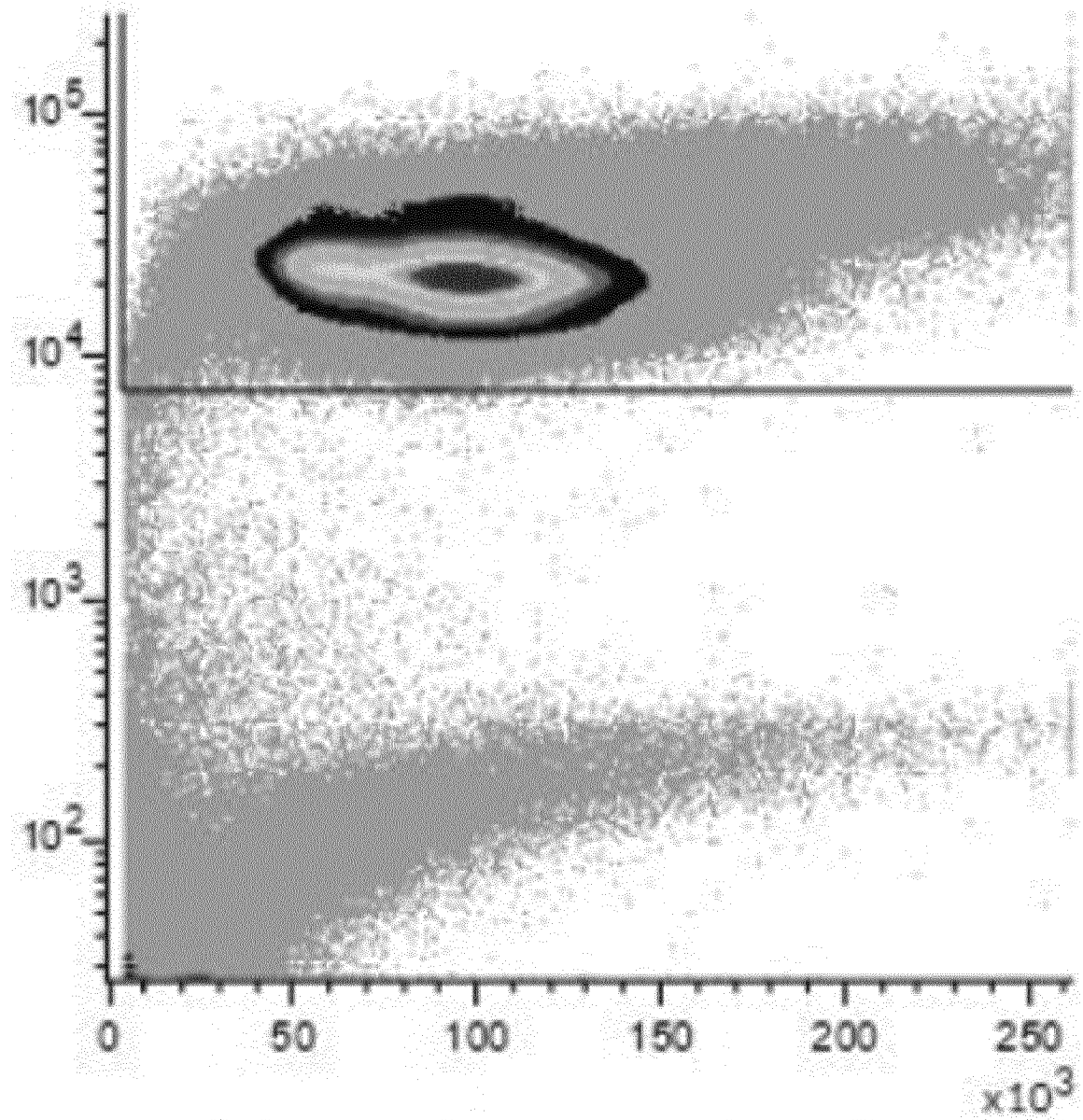


Фиг. 11

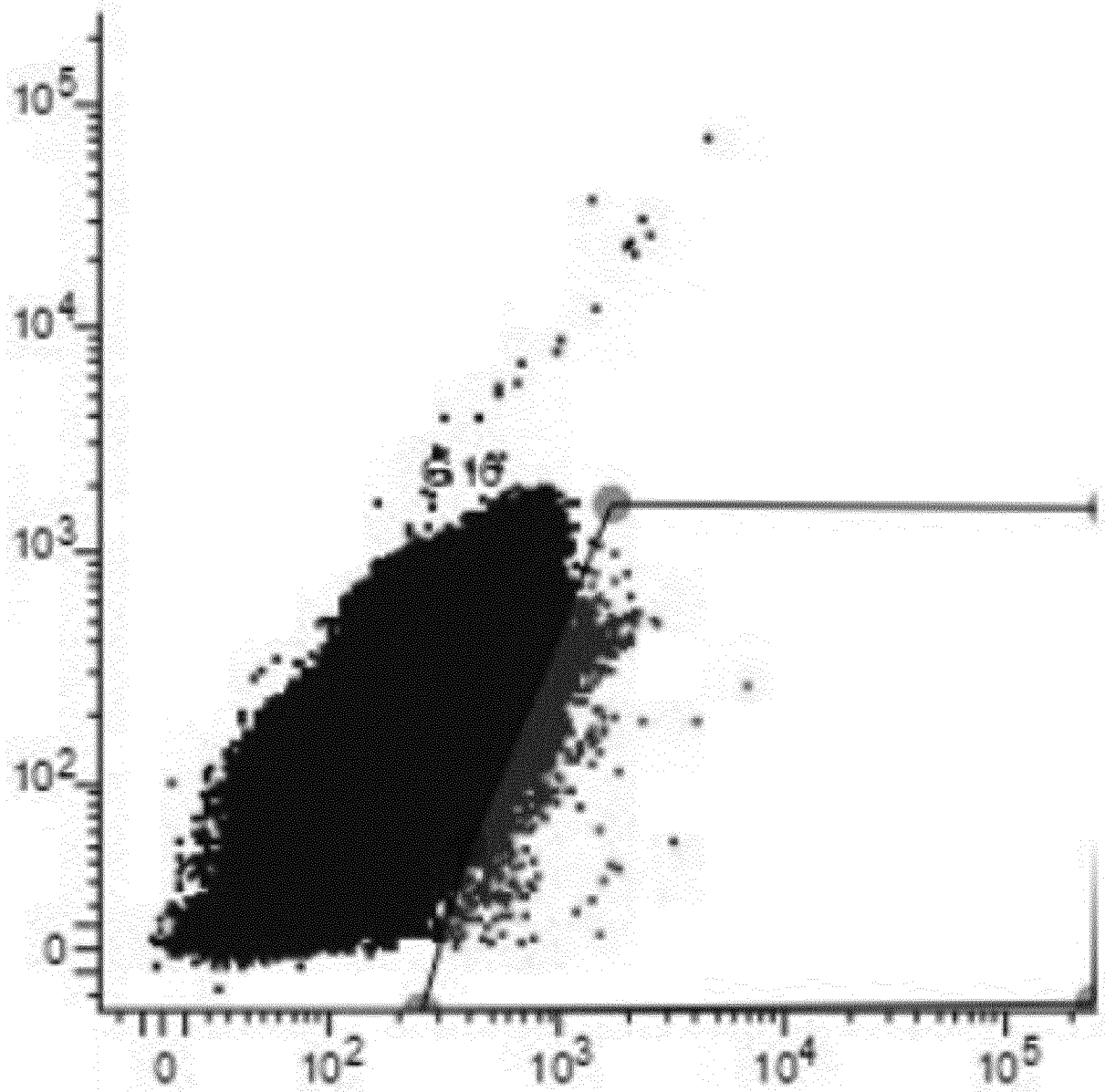
А)



В)

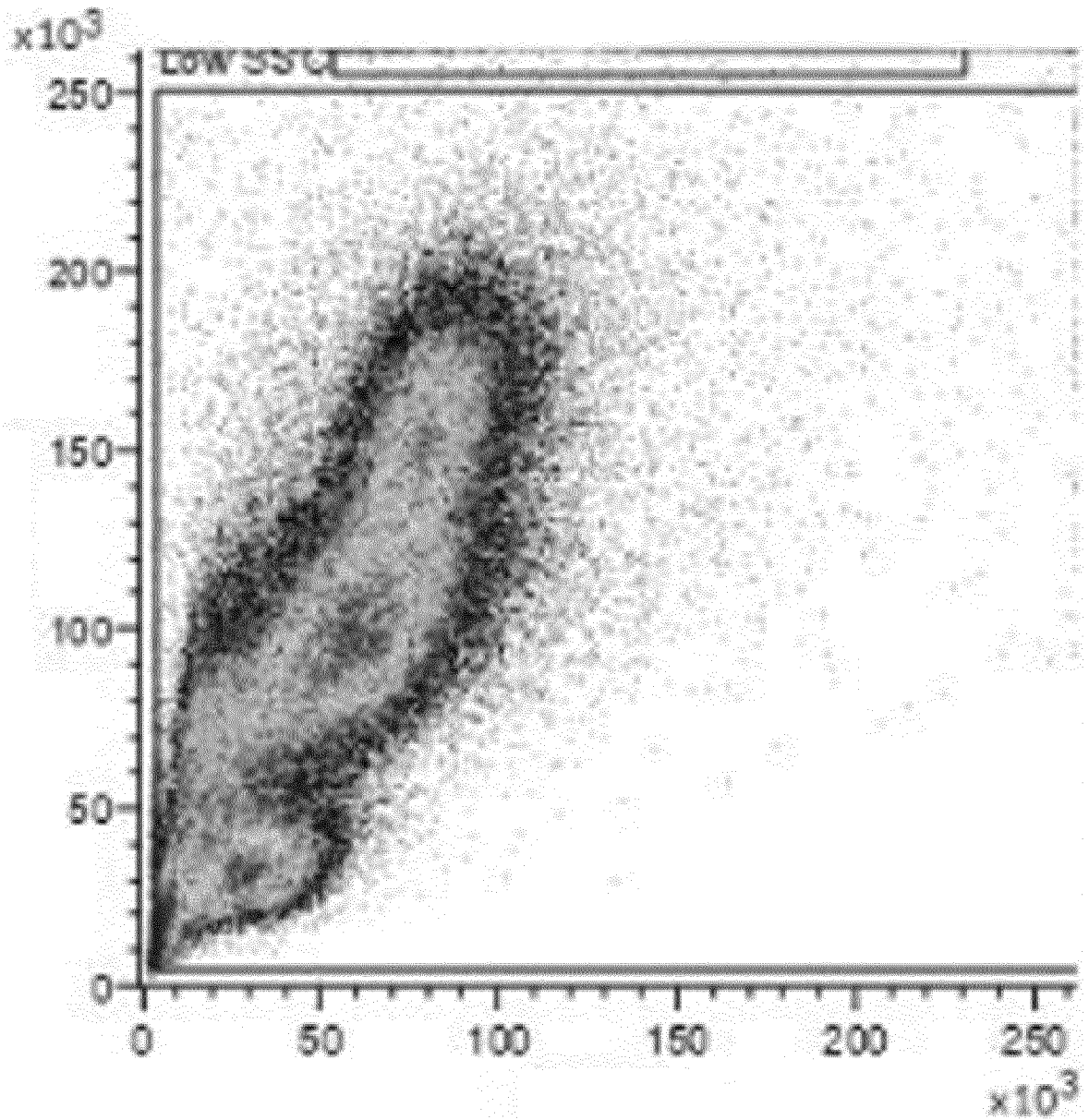


С)

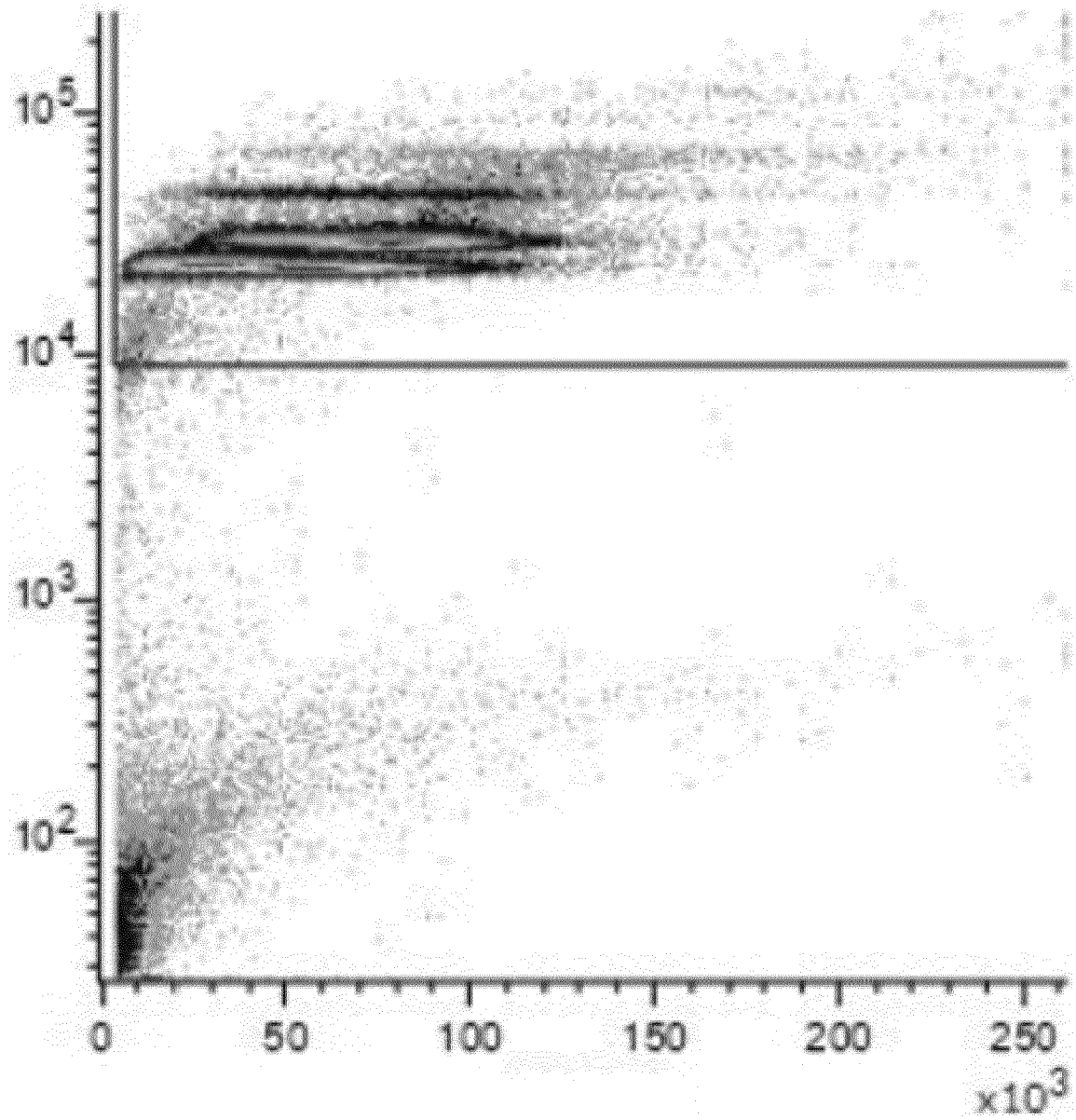


Фиг. 12

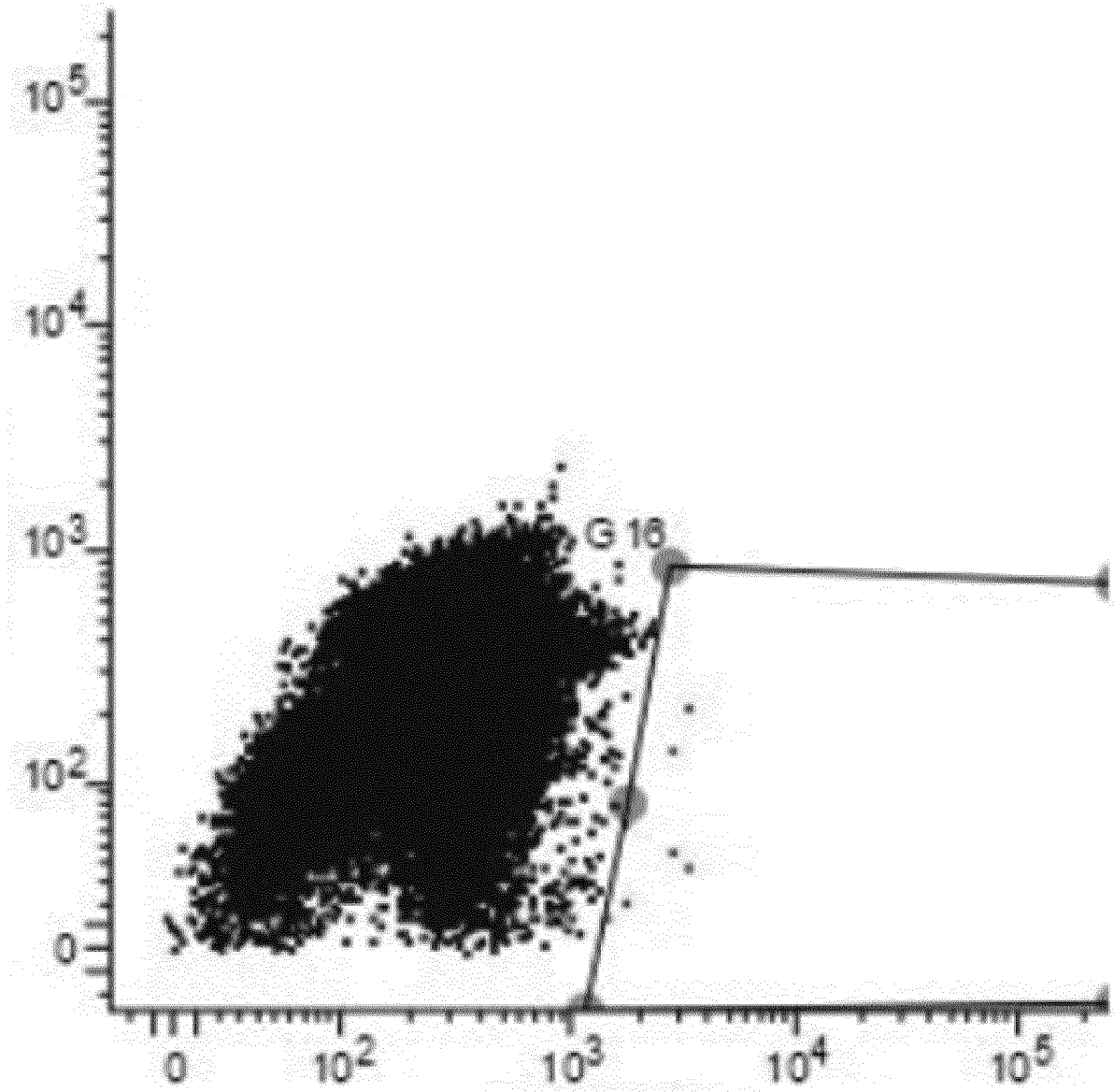
А)



В)

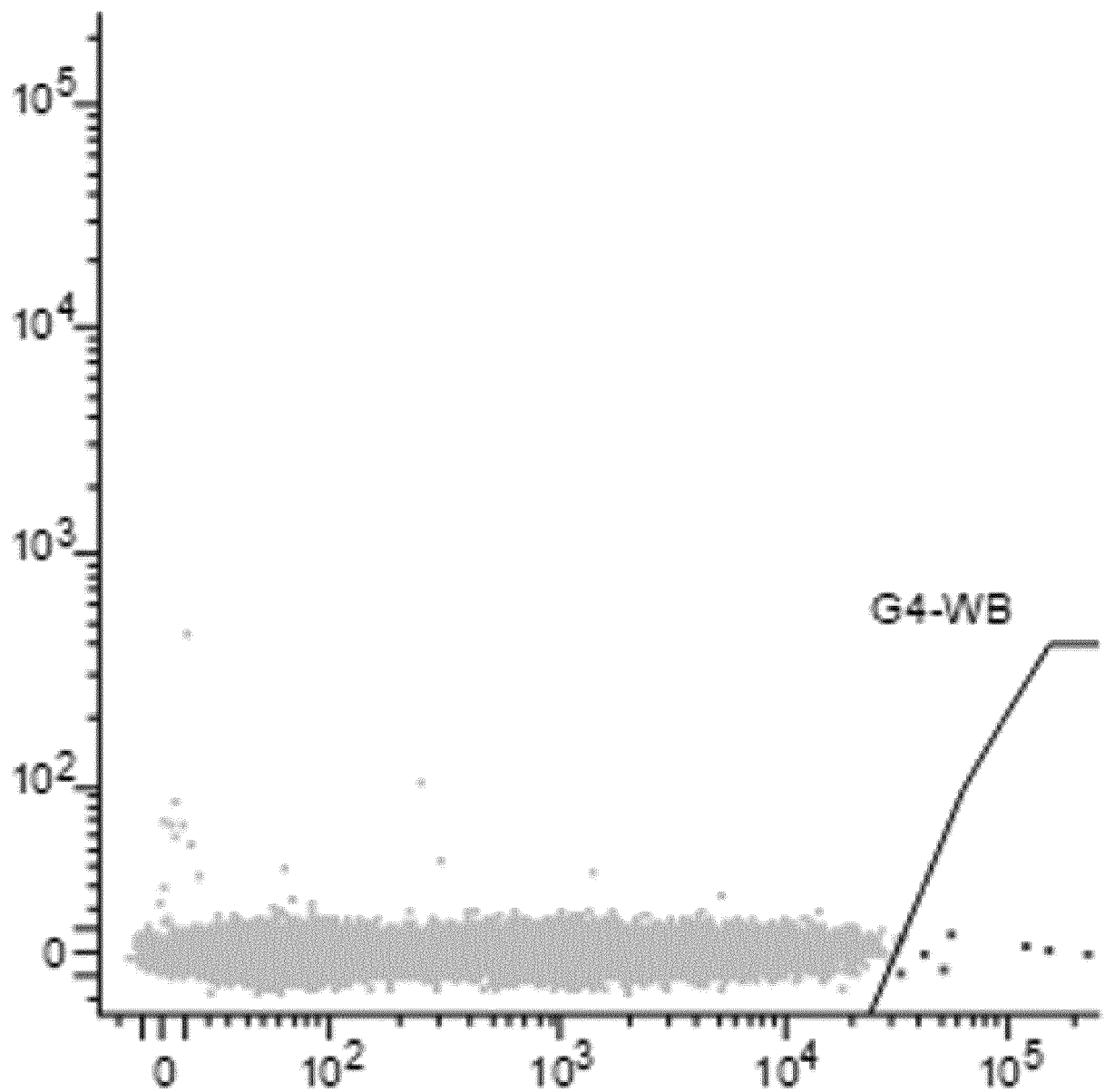


С)

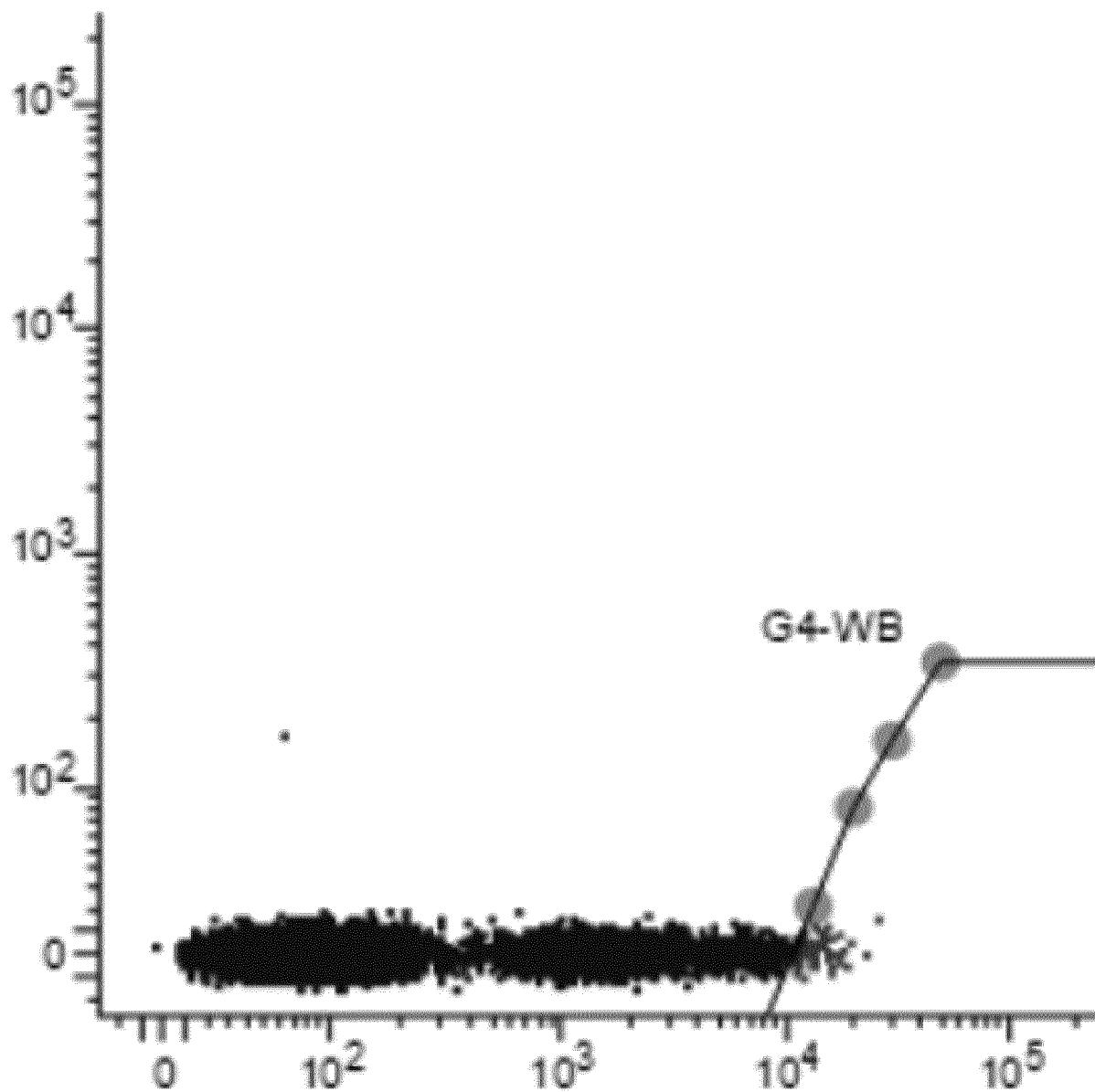


Фиг. 13

А)

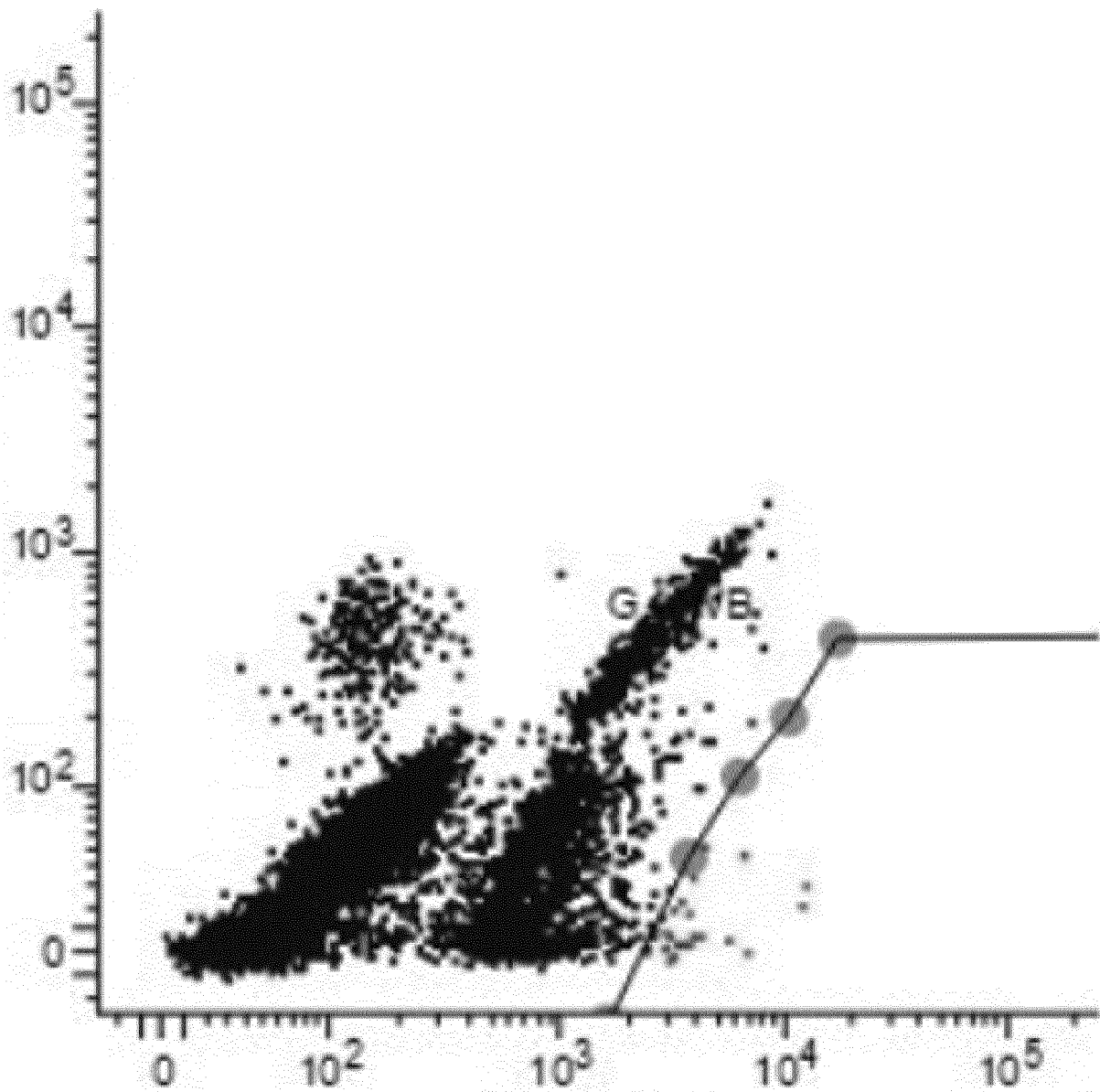


В)



Фиг. 14

А)



В)

