

MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 94 751

NOME: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, americana, (Estado da California), industrial e comercial, com sede em 300 Lakeside Drive, 22nd Floor,, Oakland, California 94612-3550, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DE ADN DE CADEIA ÚNICA E SUA APLICAÇÃO PARA A COLORAÇÃO ESPECÍFICA DE CROMOSSOMAS"

INVENTORES: JOE W. GRAY, DANIEL PINKEL e DOUGLAS TKACHUK

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.

Nos Estados Unidos da América em 19 de Julho de 1989, 1 de Dezembro de 1989 e 20 de Março de 1990, respectivamente sob os Nºs. 382,094, 444,669 e 497,098.

Wifama²

R E S U M O

A invenção refere-se a processos e composições para o mancha-
mento específico de cromossomas baseados em sequências de áci-
do nucleico contidas em amostras de ácido nucleico. Os referi-
processos produzem modelos de manchas que podem ser ajustados
para análises citogenéticas específicas. As mencionadas amos-
tras são adequadas para a hibridização "in situ" e mancham,
tanto o material cromossômico em interfase como em metafase,
com sinais dignos de confiança. As amostras de ácido nucleico
têm tipicamente uma complexidade superior a 50 kb, dependendo
a complexidade da aplicação citogenética. Proporcionam-se pro-
cessos e reagentes para a detecção de rearranjos genéticos.
Proporcionam-se amostras e estojos para a realização de ensaios
para a aplicação na detecção dos rearranjos genéticos, especi-
almente para uso na citogenética dos tumores, na detecção de
sítios relacionados com doenças, especificamente cancro, tais
como a leucemia mielogénica crónica (CML) e para a dosimetria
biológica. Descrevem-se os processos e os reagentes para a pes-
quisa citogenética, para a diferenciação de doenças citogenetica-
mente semelhantes, mas geneticamente diferentes, e para muitas
aplicações em diagnóstico e prognóstico. Além disso, propor-
ciona-se um processo para a preparação e a aplicação de amos-
tras de ácido nucléico de uma cadeia, específicas dos cromosso-
mas, a ADN assinalado, de cadeia dupla.

O Governo dos Estados Unidos tem direitos sobre a presente in-
venção de acordo com o Contrato nº. W-7405-ENG-48 entre o Mi-

Wifair³

nistério da Energia Americano e a Universidade da Califórnia, para a operação do Lawrence Livermore National Laboratory.

Domínio da Invenção

A presente invenção refere-se de uma maneira geral, ao campo dos citogenéticos e, mais particularmente, ao campo dos citogenéticos moleculares. A invenção refere-se a métodos, para identificar e classificar cromossomas. Ainda mais em particular, a presente invenção refere-se a amostras de ácido nucleico que podem ser designadas pelos processos aqui descritos para produzir distribuições de coloração que se podem estender ao longo de um ou mais cromossomas totais, e/ou ao longo de uma região ou regiões num ou mais cromossomas, incluindo amostras de coloração que se estendem sobre todo o genoma. Os modelos de coloração podem ser talhados para qualquer aplicação citogenética desejada, incluindo aplicações pré-natais, de tumores, e aplicações citogenéticas relacionadas com doenças entre outras. A invenção proporciona composições de amostras de ácido nucleico e métodos de coloração de cromossomas com as mesmas, a fim de identificar cromossomas normais e anormalidades cromossômicas em sequências de metafase e em núcleos de interfase. Os modelos de manchamento que produzem as amostras da presente invenção facilitam a identificação microscópica e/ou citométrica de passagem de cromossomas normais e anormais e a caracterização da natureza genética das anormalidades em particular.

Embora a maior parte dos exemplos aqui descritos digam respeito a cromossomas provenientes de seres humanos, e a maior parte da linguagem aqui empregue se relacione com problemas humanos, o conceito de usar amostras do ácido nucleico para manchar

4
Wifaria

ou pintar cromossomas é aplicável a cromossomas provenientes de qualquer origem incluindo de plantas e animais.

Enquadramento da Invenção

As anormalidades cromossômicas estão associadas a desordens genéticas, a doenças degenerativas e a exposição a agentes conhecidos por causarem doenças degenerativas, em particular o cancro, German, "Studying Human Chromosomes Today", American Scientist, Vol. 58 pág. 182-201 (1970); Junis, "The Chromosomal Basis of Human Neoplasia", Science, Vol. 221, pág. 227236 (1983); e German, "Clinical Implication of Chromosome Breakage" in Genetic Damage in Man Caused by Inviromental Agentes", Berg, Ed. Pág. 65-86 (Academic Press, New York, 1979). As anormalidades cromossômicas podem ser de vários tipos, incluindo: os cromossomas individuais extra ou ausentes, porções extra ou ausentes de um cromossoma (duplicações ou anulações de segmentos) interrupções, aneis e rearranjos cromossômicos, entre outros. Os rearranjos cromossômicos ou genéticos incluem translocações (transferência de um troço de um cromossoma para outro cromossoma), dicêntricos (cromossomas com dois centrômeros), inversões (inversão na polaridade de um segmento cromossômico), inserções, amplificações e anulações.

As anormalidades cromossômicas detectáveis ocorrem com uma frequência de um em cada 250 nascimentos de seres humanos. As anormalidades que envolvem anulações ou adições de material cromossômico alteram o equilíbrio genético de um organismo, em geral, conduzem à morte do feto ou a defeitos mentais e físicos graves. O síndrome de Down pode ser causado por ter três cópias do cromossoma 21 em vez do normal 2. Este síndrome é um

Wifaria⁵

exemplo de um estado pelo número anormal de cromossomas, ou aneuploidia. O síndrome de Down pode também ser causado por uma duplicação segmentária de uma sub-região no cromossoma 21 (tal como, 21q22), que pode encontrar-se presente no cromossoma 21 ou num outro cromossoma. O síndrome de Edvard (18+), o síndrome de Patau (13+), o síndrome de Turner (XO) e o síndrome de Klinefelter (xxy) encontram-se dentro das observações numéricas mais comuns [Epstein, The Consequences of Chromosome Imbalance: Principles, Mechanisms and Models (Cambridge Univ. Press 1986); Jacobs, Am. J. Epidemiol., 105:180 (1977); e Lubs et al., Science, 169:495 (1970)]7.

O Retinoblastoma (del 13q14), o síndrome de Prader-Willi (del 15q11-q13), o tumor de Wilm's (del 11p13) e o síndrome de Cri-du-chat (del 5p) são exemplos de doenças importantes ligadas a aberrações estruturais. [Nora e Fraser, Medical Genetics: Principles and Practice, (Lea e Febiger 1989)]7.

As medidas da frequência de cromossomas estruturalmente aberrantes, por exemplo, cromossomas dicêntricos, causados por agentes clastogénicos, tais como radiação ionizante, ou mutações químicas, são largamente usadas como indicadores quantitativos de danificações genéticas causadas pelos referidos agentes, Biochemical Indicators of Radiation Impurity in Man (International Atomic Energy Agency, Vienna, 1971); e Berg, Ed. Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents (Academic Press, New York, 1979). São largamente distribuídos no meio ambiente hospedeiros de químicos potencialmente carcinogénicos e teratogénicos devido à sua actividade industrial e agrícola. Estes químicos incluem pesticidas e uma larga gama de resíduos industriais e sub-produtos, tais como hidrocarbonetos halogenados, cloreto de vinilo, benzeno, arsénico, e semelhantes, Kraybill et al., Eds. Environmental Cancer (Hemisphere Publishing Corporation, New York, 1977), Medidas sensí-

veis de interrupções cromossômicas e outras anormalidades podem formar a base de metodologias dosimétricas e de verificação de risco melhoradas para avaliar as consequências da exposição a esses agentes ocupacionais e do meio ambiente.

Os processos correntes para a selecção genética e a dosimetria biológica envolvem a análise de cariótipos. Um cariótipo é o complemento do cromossoma particular de um indivíduo ou de um grupo de indivíduos da mesma família, conforme definido pelo número e morfologia dos cromossomas usualmente em metafase mitótica. Inclui elementos tais como o número total de cromossomas, o número cópia dos tipos individuais de cromossomas (por exemplo, o número de cópias do cromossoma X), e a morfologia cromossômica por exemplo, conforme medida pelo comprimento, índice centromérico, conjugação, ou semelhantes. As anormalidades cromossômicas podem ser detectadas pelo exame dos cariótipos. Os cariótipos são convencionalmente determinados pela coloração de uma metafase do organismo ou cromossomas condensados de outra maneira (por exemplo, por condensação prematura dos cromossomas). São usados cromossomas condensados uma vez que, até há pouco tempo, não era possível visualizar cromossomas de interfase devido à sua condição dispersa e à falta de fronteiras visíveis entre os mesmos no núcleo da célula.

Têm sido desenvolvidas várias técnicas citológicas com base em manchas químicas que produzem riscas longitudinais em cromossomas condensados geralmente referidas como bandas. O aspecto da banda de cada cromossoma dentro de um organismo permite usualmente uma identificação sem ambiguidade de cada tipo de cromossoma, Latt, "Optical Studies of Metaphase Chromosome Organization", Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. 5, pag. 1-37 (1976). Uma detecção precisa de algumas anormalidades cromossômicas importantes, tais como translocações e inversões, tem requerido essa análise em bandas.

Wifama⁷

Infelizmente, a referida análise em bandas convencional requer a cultura de células e a preparação de dispersões de metafase de elevada qualidade, o que é moroso e trabalhoso e muitas vezes difícil ou mesmo impossível. Por exemplo, as células de muitos tipos de tumores são difíceis de cultivar e não é claro que as células cultivadas sejam representativas da população das células do tumor original. As células dos fetos capazes de serem cultivadas necessitam de ser obtidos por meio de meios invasivos e necessitam de ser cultivadas durante várias semanas a fim de se obterem células de metafase suficientes para análise. Em muitos casos, as manchas em bandas nos cromossomas anormais não permitem uma identificação sem ambiguidade dos troços dos cromossomas normais que os caracterizam. Essa identificação pode ser importante para indicar a localização de genes importantes que estão envolvidos na anormalidade. Além disso, a sensibilidade e o poder de resolução dos métodos de cariotipagem correntes estão limitados pelo facto de que os cromossomas múltiplos ou as regiões cromossómicas têm características de coloração altamente semelhantes e essas anormalidades (tais como as anulações) que envolvem apenas uma fracção de uma banda não são detectáveis. Consequentemente, os referidos métodos são substancialmente limitados para o diagnóstico e para a análise pormenorizada de síndromas genéticos cotíguos, tais como a trisomia parcial, o síndrome de Prader-Willy [Emanuel, Am. J. Hum. Genet., 43-575 (1988); Schmickel, J. Pediatr., 109-231 (1986)]⁷ e o retinoblastoma [Sparkes, Biochem. Biophys. Acta 780:95 (1985)]⁷.

Deste modo, a análise em bandas convencional tem várias limitações importantes que incluem as seguintes: 1) é muito trabalhosa, morosa e requer uma análise altamente treinada. 2) só pode ser aplicada a cromossomas condensados. 3) Não permite a detecção de aberrações estruturais que envolvam menos de 3-15 megabases (Mb), dependendo da natureza da aberração e da re-

Wifaria⁸

solução da técnica de banda [Landegren et al., Science, 242:229 (1988)]⁷. A presente invenção proporciona composições de amostras e métodos para ultrapassar as referidas limitações de análise em banda convencional.

Os processos de manchamento químicos da técnica anterior proporcionam modelos sobre um genoma por razões que não se entendem muito bem e que não podem ser modificados conforme necessário para serem usados em aplicações diferentes. Os referidos modelos de manchamento químicos foram usados para marcar os locais de ligação das amostras. Contudo, apenas ocasionalmente, e com grande esforço, foi usada a hibridização in situ para se obter alguma informação acerca da posição da lesão, por exemplo, uma região de interrupção em relação a uma sequência de ADN em particular. A presente invenção ultrapassa a inflexibilidade de manchamento químico no sentido de que mancha um genoma num modelo com base na sequência de ácido nucleico; por isso, o modelo pode ser alterado conforme for necessário alterando a sequência de ácido nucleico da amostra. Os modelos de manchamento produzidos pelas amostras, da presente invenção, proporcionam marcos fundamentais dignos de confiança que são úteis na análise citogenética.

A detecção automatizada das anormalidades estruturais dos cromossomas com a análise de imagem de bandas quimicamente manchadas necessita do desenvolvimento de um sistema que possa detectar e interpretar os modelos de bandas produzidos em cromossomas de metáfase por meio de técnicas convencionais. Ficou provado ser muito difícil identificar de forma digna de confiança por meios automatizados os cromossómas normais que haviam sido quimicamente manchados; é ainda muito mais difícil diferenciar cromossomas anormais tendo anormalidades estruturais, tais como, translocações. A detecção automatizada eficaz de translocações em cromossomas convencionalmente manchadas

9
Wifaria

não foi realizada depois de uma década de trabalho intensivo. Os modelos de bandas produzidas pelas amostras da presente invenção são apropriados para a referida detecção e análise automatizada.

Nos anos recentes têm-se verificado avanços rápidos no estudo da estrutura do cromossoma e na sua relação com o conteúdo genético e a composição de ADN. Em parte, o progresso chegou na forma de métodos aperfeiçoados de marcação de genes, com base na disponibilidade de grandes quantidades de fragmentos de ADN e RNA puros para amostras produzidas por técnicas de engenharia genéticas, e.g., Kao, "Somatic Cell Genetics and Gene Mapping", International Review of Cytology, Vol. 85, pág. 109-146 (1983) e D'Eustachio et al., "Somatic Cell Genetics in Gene Families", Science, Vol. 220, pag. 9, 19-924 (1983). As amostras para delinear os genes, compreendem fragmentos marcados de ADN ou RNA de cadeia única ou de cadeia dupla que são hibridizados para sítios complementares no ADN cromossômico. Com as referidas amostras foi de importância crucial produzir amostras puras, homogêneas para minimizar as hibridizações em locais que não fossem no sítio de interesse, Henderson, "Cytological Hybridization to Mammalian Chromosomes", International Review of Cytology, Vol. 76, pag. 1-46 (1982).

O processo de hibridização envolve a decifração ou fusão dos ácidos nucleicos de cadeia dupla de amostra e sinal, por meio de aquecimento ou outros meios (a não ser que a amostra e o sinal sejam ácidos nucleicos de cadeia única). Esta fase é por vezes referida como desnaturação do ácido nucleico. Quando a mistura dos ácidos nucleicos de amostra e do sinal arrefece, recombina-se cadeias que tenham bases complementares, ou temperam-se. Quando uma amostra se tempera com um ácido nucleico sinalizado, a localização de amostra no sinal pode ser detectada por meio de uma risca efectuada pela amostra ou por al-

Wifama

— algumas características intrínsecas da amostra ou de dupla amostra-sinal. Quando o ácido nucleico do sinal se mantém no seu estado biológico natural, por exemplo, ADN em cromossomas, mRNA em citoplasma, porções de cromossomas ou núcleos de células (não obstante "albeit" fixos ou alterados por meio de técnicas de preparação), o processo de hibridização é referido como hibridização *in situ*.

As amostras da hibridização *in situ* limitaram-se inicialmente a identificar a localização dos genes ou outras sequências do ácido nucleico bem definidas, nos cromossomas ou nas células. Foram usadas comparações da marcação de amostras de cópia única para cromossomas normais e anormais, a fim de examinar as anormalidades cromossômicas. Cannizzaro et al., Cytogenetics and Cell Genetics, 39:173-178 (1985). Podia também ser determinada a distribuição dos sítios de ligação múltiplos em amostra repetitivas.

Foi usado hibridização com amostras que têm um sítio sinalizado num genoma haploide, amostras de cópia única ou amostras de sequência única, a fim de marcar as localizações de genes em particular no genoma [Harper e Sanders, "Localization of the Human Insulin Gene to the Distal End of the Short Arm of Chromosome 11", Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 78, pag. 4458-4460 (1981); Kao et al., "Assignment of the Structural Gene Coding for Albumin to Chromosome 4", Human Genetics, Vol. 62, pag. 337-341 (1982)]; contudo as referidas hibridizações não são seguras e dignas de confiança quando o tamanho do sítio sinalizado é pequeno. Uma vez que a sequência do sinal para amostras de cópia única de baixa complexidade é pequena, apenas uma porção dos sítios potenciais do sinal numa população de células formam hibridizados com a amostra. Deste modo, a marcação da localização do sítio de ligação específico de amostra foi complicado por meio de sinais de fundo pela ligação não

específica da amostra e também pelo barulho no sistema de detecção (por exemplo, autoradiografia ou imunoquímico). A falta de segurança dos sinais para essas amostras de técnica anterior requerem uma análise estatística das posições dos sinais de hibridização aparentes em células múltiplas para marcar o sítio de ligação específico da amostra.

Sequências repetitivas diferentes podem ter distribuições diferentes nos cromossomas. Podem espalhar-se por todos os cromossomas tal como na referência agora citada, ou podem estar concentrados em regiões compactas do genoma, tal como nos centrómeros dos cromossomas, ou podem ter outras distribuições. Em alguns casos, uma tal sequência repetitiva localiza-se de forma predominante, num único cromossoma, sendo por isso uma sequência repetitiva de cromossomas específicos [Willard et al., "Isolation and Characterization of a Major Tandem Repeat Family from the Human X chromosome", Nucleic Acids Research, Vol. 11, pag. 2017-2033 (1983)]⁷.

Pode ser usada uma amostra para sequência repetitiva partilhada por todos os cromossomas, a fim de discriminar cromossomas de espécies diferentes se a sequência for específica para uma das espécies. Pode ser usado desta forma o ADN genómico total de uma espécie que seja rico nessas sequências repetitivas. [Pinkel et al. (III), PNAS USA, 83 : 2 934 (1986); Manolidis Hum. Genetic., 71:288 (1985) e Durnam et al., Somatic Cell Molec. Genet., 11 : 571 (1985)]⁷.

Recentemente, houve uma disponibilidade aumentada de amostras para sequências repetitivas (amostras repetitivas) que hibridizam de forma intensa e específica para seleccionar cromossomas - [Trast et al., Hum. Genet., 78: 251 (1988) e as referências aqui citadas]⁷. As referidas amostras encontram-se agora disponíveis para mais de metade dos cromossomas humanos.

Em geral, eles ligam-se a sequências repetitivas em regiões compactas do cromossoma de sinal junto do centrômero. Contudo, foi referido que uma amostra hibridizada para o cromossoma humano 1p36, existindo várias amostras que hibridizam para o cromossoma Yq. A hibridização com as referidas amostras permite a identificação rápida de cromossomas em dispersões de metáfase, a determinação do número de cópias de cromossomas seleccionados em núcleos de interfase /Pinkel et al., (I), PNAS USA, 83:2934 (1986); Pinkal et al., (II), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:151 (1986) e Cremer et al., Hum. Genet., 74: 346 (1986) e a determinação das posições relativas dos cromossomas em núcleos de interfase /Trask et al., supra; Pinkel et al., (I), Supra; Pinkel et al., (II) Supra; Manuelidis, PNAS USA, 81:3123 (1984); Rappold et al., Hum. Genet., 67-317 (1984); Schardin et al., Hum. Genet., 71:282 (1985); e Manuelidis, Hum. Genet., 71:288 (1985)7.

No entanto, muitas aplicações estão ainda limitadas pela falta de amostras apropriadas. Por exemplo, até os métodos aqui descritos serem inventados as amostras com especificidade suficiente para o diagnóstico pré-natal não se encontravam disponíveis para o cromossoma 12 ou 21. Além disso, as amostras repetitivas não são muito úteis para detectar aberrações estruturais, uma vez que é baixa a probabilidade de que as aberrações envolvam a região sobre a qual a amostra hibridiza.

A presente invenção ultrapassa as limitações da técnica anterior sobre o uso de amostras e melhora dramaticamente a aplicação de hibridização in situ para a análise citogenética. Tal como se indicou acima, as amostras, da técnica anterior não têm sido úteis para a análise citogenética em profundidade. As amostras de cópia única de baixa complexidade, neste estágio de tecnologia de hibridização, não geram sinais seguros e dignos de confiança. Embora as amostras repetitivas propor-

cionem sinais seguros e dignos de confiança, os referidos sinais não podem ser talhados para aplicações diferentes devido à distribuição fixa de sequências repetitivas num genoma. As amostras da presente invenção combinam a segurança e confiança das amostras repetitivas com a flexibilidade de serem capazes de talhar o aspecto de ligação da amostra para qualquer aplicação desejada.

As capacidades melhoradas das amostras da presente invenção deriva da sua aumentada complexidade. O aumento de complexidade de uma amostra aumenta a probabilidade, e consequentemente a intensidade, de hibridização para a região pretendida, mas também aumenta a probabilidade de hibridização não-específicas resultando em sinais de fundo. Contudo, dentro do conceito da presente invenção, considerou-se que esses sinais de fundo seriam distribuídos aproximadamente ao acaso no genoma. Consequentemente, o resultado limpo é de que a região pretendida pode ser visualizada com um contraste aumentado contra esses sinais de fundo.

São aqui exemplificadas amostras numa média de complexidade aproximada entre cerca de 50 000 bases (50 kb) e centenas de milhões de bases. As referidas amostras representativas são para locais compactos e cromossomas humanos completos. Antes da presente invenção, as amostras para técnicas de hibridização in situ tinham complexidades inferiores a 40 kb e, mais tipicamente na ordem de uns poucos kb.

O material cromossómico de cloração com as amostras da presente invenção é significativamente diferente do manchamento químico da técnica anterior. A especificidade do manchamento produzido pela amostra da presente invenção vem de uma fonte inteiramente nova - as sequências de ácido nucleico num genoma. Assim, os aspectos de manchamento da presente invenção podem



ser designados para clarificar a informação genética fundamental importante para aplicações particulares.

Os processos da presente invenção para construir amostras de qualquer especificidade desejada proporcionam avanços significativos num largo espectro de estudos citogenéticos. A análise pode ser levada a cabo em cromossomas de metafase e em núcleos de interfase. As técnicas da presente invenção podem ser especialmente vantajosas para aplicações em que a riscagem de elevada qualidade por meio de métodos convencionais é difícil ou suspeita de originar uma informação tendenciosa, por exemplo, em citogenéticos de tumores. Os reagentes sinalizados para locais de lesões conhecidas como sendo diagnóstico ou prognosticamente importantes, tais como translocações e anulações de tipos específicos de tumores, entre outros os arranjos genéticos específicos de tumores, permitem o rápido reconhecimento dessas anormalidades. Quando a velocidade de análise é a preocupação predominante, por exemplo a detecção de aberrações cromossómicas de baixa frequências provocadas por agentes ambientais tóxicos, as composições da presente invenção permitem um aumento dramático da eficácia de detecção em comparação com as técnicas anteriores baseadas na riscagem do cromossoma convencional.

Além disso, a selecção pré-natal para as aberrações dos cromossomas ligadas com a doença (por exemplo, trisomia 21) é aumentada pela rápida detecção dessas aberrações por meio dos métodos e composições da presente invenção. A análise de aneuploidia de interfase de acordo com a presente invenção é particularmente significativa para o diagnóstico pré-natal na medida em que origina resultados mais rápidos do que os obtidos por meio de métodos de cultura de células. Além disso, as células de fetos separadas do sangue materno, que não podem ser cultivadas por processos de rotina e, por isso, não podem ser analisadas por meio de técnicas de cariotipagem convencionais,

podem ser analisadas pelos métodos e composições da presente invenção. Adicionalmente, a intensidade, o contraste e as combinações de cor dos aspectos de manchas, juntamente com a capacidade de talhar os aspectos para aplicações particulares, aumentam as oportunidades para a análise citogenética automatizada, por exemplo por meio de citometria de passagem ou microscopia computadorizada e análise de imagem.

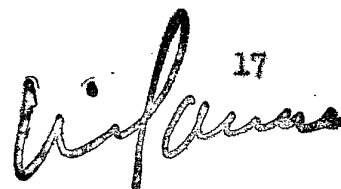
O presente pedido reivindica especificamente reagentes específicos de cromossomas para a detecção de rearranjos genéticos e métodos para usar esses reagentes para detectar os referidos rearranjos. Os rearranjos genéticos representativos assim detectados são os rearranjos que produzem um gene de fusão-BCR-ABL- que é diagnóstico da leucemia mielogénica crónica (CML).

A leucemia mielogénica crónica (CML) é uma proliferação neoplástica de células da medula do osso geneticamente caracterizada pela fusão dos genes de BCR e ABL nos cromossomas 9 e 22. Essa fusão envolve usualmente uma translocação recíprica t(9;22) (q34;q11), que produz o cromossoma de Philadelpia citogeneticamente distinto (Ph¹). Contudo, rearranjos mais complexos podem causar a fusão de BCR-ABL. Ao nível molecular, a fusão pode ser detectada pela análise de Southern ou pela amplificação in vitro do mRNA do gene de fusão usando a reacção de cadeia de polimerase (PCR). Essas técnicas são sensíveis mas não podem ser aplicadas a células únicas.

De forma clara, um método sensível para detectar anormalidades cromossómicas e, mais especificamente, rearranjos genéticos, tais como, por exemplo, os rearranjos específicos de tumores associados com o CML seriam um instrumento altamente útil para a selecção genética. A presente invenção proporciona os referidos instrumentos.

As referências seguintes são indicadas nos testes seguintes por número, conforme indicado:

1. A. de Klein et al., Nature 300, 765 (1982).
2. J. Graffen et al., Cell 36,93 (1984).
3. N. Heisterkamp et al., Nature 306,239 (1983).
4. E. Shtivelman et al., Blood 69,971 (1987).
5. J. B. Konopka, S. M. Watanabe, O.M. Witte, Cell 37,1035 (1984).
6. Y. Ben-Reriah et al., Science 233,212 (1986).
7. P.O. Howell and D.A. Hungerford, Science 132,1497 (1960/).
8. J. D. Rowley, Nature 243,290 (June 1973).
9. G. Grosveld et al., Mol Cell Biol 6,607 (1986).
10. E. Canaani et al., Lancet 1,593 (1984).
11. R.P. Gale and E. Canaani, Proc Natl Acad Sci USA 81,5468 (1984).
12. Konopka J. B. et al., Proc Natl Acad Sci USA 82:1810 (1985).
13. P. Benn et al., Cancer Genet Cytogenet 29,1 (1987).
14. S. Abe et al., Cancer Genet Cytogenet 38,61 (1989).
15. E. Shtarid et al., Blood 72,485 (1988).
16. I. Dube et al., Genes Chromosomes and Cancer 1,106 (1989).
17. A. J. Fishleder, B. Shadrach and C. Tuttle, Leukemia 3:10,746 (1989).
18. C.R. Bartram et al., J.Exp Med 164 (5):1389 (1986).



19. S. Hiroswa et al., Am L Hematol 28,133 (1989).
20. M. S. Lee et al., Blood 73 (8):2165 (1989).
21. E.S. Kawasaki et al., Proc Natl Acad Sci USA 85,5698 (1988).
22. M.S. Roth et al., Blood 74,882 (1989).
23. A. L. Hooberman et al., Blood 74, 1101 (1989).
24. C.A. Westbrook et al., Blood 71(3):297-702 (1988).
25. B. Trask, D. Pinkel, and G. van den Engh, Genomics 5,710 (1989).
26. S.J. Collins and M. T. Groudine, Proc Natl Acad Sci USA 80,4813 (1983).
27. D. Pinkel et al., Proc Natl Acad Sci USA 83, 2934 (1986).
28. D. Pinkel, T. Straume and J. W. Gray., Proc Natl Acad Sci USA 85,9138 (1988).
29. B. Trask and J. Hamlin, Genes and Development, 3:1913 (1989).
30. J. B. Lawrence, C.A. Villnave and R.H.Singer, Cell 42,51 (1988).
31. G.D. Johnson and J. G. Nogueira J. Immunol. Methods 43,349 (1981).
32. Hegewisch-Becker et al., J. Cell. Biochem. (Suppl.) 13E,289 (1989).
33. Kohler et al., "Expression of BCR-ABL from transcripts Following Bone Marrow Transplant for Philadelphia Chromosome Positive Leukemias", (manuscript submitted).
34. Heisterkamp et al., 315:758 (1985).
35. Heisterkamp et al. J. Molec. Appl. Genet., 2:57 (1983).

A fusão do feto oncogene c-ABL do longo braço do cromossoma 9 com o gene BCR do cromossoma 22 é uma descoberta consistente no CML (1-3). Essa alteração genética leva à formação de uma transcrição BCR-ABL que é traduzida para formar uma proteína de 210 kd presente em quase todos os casos de CML (4-6). Em 90 % dos casos, o gene de fusão resulta de uma translocação recíproca que envolve os cromossomas 9 e 22 que produzem um cromossoma acrocêntrico pequeno citogeneticamente distinto, denominado cromossoma de Philadelphia (Ph^1) (7-12), Fig. 8. Contudo os citogenéticos padrão não têm a resolução para distinguir de forma imediata e precisa as regiões de interrupção espacadas tais como os característicos do CML e a leucemia linfocítica aguda (ALL) e as faltas de fusões produzidas por mais rearranjos complexos. A marcação e a clonação das regiões de interrupção em ambos os genes tem levado a técnicas moleculares capazes de demonstrar a fusão BCR-ABL em casos de CML em que o cromossoma Ph^1 não poderia ser detectado citogeneticamente (13-16). A análise de Southern para os rearranjos BCR tornou-se um padrão para o diagnóstico de CML. Mais recentemente a fusão foi detectada pela amplificação in vitro de uma transcrição de cADN copiado de CML mRNA usando a transcriptase inversa (17-23). Essa técnica permite a detecção de transcrição de BCR-ABL das células de CML presentes em baixas frequências. Ambas essas técnicas utilizam o ácido nucleico obtido de populações de células a fim de que não possa ser possível a correlação entre o genotipo e o fenotipo para células individuais.

Descrevem-se aqui reagentes específicos de cromossomas e métodos para detectar rearranjos genéticos, tais como os aqui exemplificados para a fusão de BCR-ABL que fornece informação não disponível pelas técnicas existentes.



SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a coloração de material cromossómico com base em sequências do ácido nucleico que empregam uma ou mais amostras de ácido nucleico. Os referidos métodos produzem aspectos de manchas que podem ser talhadas para análises citogenéticas específicas. Um outro objectivo da presente invenção consiste em produzir amostras de ácido nucleico que são úteis para a análise citogenética que mancham material cromossómico com sinais seguros e dignos de confiança. As referidas amostras são apropriadas para a hibridização in situ. As amostras de ácido nucleico preferidas para certas aplicações da presente invenção são as amostras de superfície complexidade para mancharem de forma segura e digna de confiança cada um dos dois ou mais sítios que constituem o objectivo.

A presente invenção proporciona métodos e composições para a coloração de material cromossómico. As composições de amostras da presente invenção no estado actual das técnicas de hibridização são tipicamente de elevada complexidade, usualmente superior a cerca de 50 kb de complexidade dependendo a complexidade da aplicação para a qual a amostra é designada. Em particular, proporcionam-se reagentes de manchamento específico de cromossomas que compreendem misturas heterogêneas de fragmentos de ácido nucleico, tendo cada um dos fragmentos uma fracção substancial das suas sequências substancialmente complementares de um troço do ácido nucleico para o qual se desejar o manchamento, específico o ácido nucleico alvo, de preferência o material cromossómico alvo. Em geral, os fragmentos de ácido nucleico são marcados pelos meios conforme aqui descritos e exemplificados. Contudo, os fragmentos de ácido nucleico não necessitam de ser directamente marcados para que liguem os fragmentos da amostra ao sinal a ser detectado; por exemplo,

essa ligação do ácido nucleico pode ser detectado por anticorpos duplex anti-RNA/ADN e anticorpos para dímeros de timidina. Os fragmentos de ácido nucleico das misturas heterogêneas incluem RNA ou ADN de cadeia dupla ou de cadeia única.

A presente invenção refere-se a reagentes de cromossomas específicos e a métodos de coloração de material cromossômico sinalizado que está na proximidade de um rearranjo genético suspeito.

O referido rearranjo genético inclui, mas não está limitado a translocações, inversões, anulações, amplificações, e inserções. Quando o referido rearranjo genético está associado com uma doença, os referidos reagentes de cromossomas específicos são referidos como reagentes de doenças específicos ou amostras. Quando o referido rearranjo genético está associado ao cancro, esses reagentes são referidos como reagentes ou amostras de tumor específicos.

A presente invenção proporciona amostras de ácido nucleico que mancham de forma segura e digna de confiança materiais cromossômicos sinalizados nas proximidades de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos. As referidas amostras de ácido nucleico, úteis para a detecção de rearranjos genéticos são tipicamente de elevada complexidade. As referidas amostras de ácido nucleico compreendem, de preferência, sequências de ácido nucleico que são substancialmente homólogas a sequências de ácido nucleico em regiões cromossômicas que flanqueiam e/ou se estendem parcial ou completamente ao longo de regiões de interrupção com rearranjos genéticos.

A presente invenção proporciona ainda métodos e rearranjos para distinguir entre rearranjos cromossômicos citogeneticamente semelhantes mas geneticamente diferentes.

Exemplificam-se especificamente na presente invenção reagentes de cromossomas específicos e métodos para detectar rearranjos genéticos, por exemplo, translocações, anulações, amplificações e inserções, que produzem a fusão de BCR-ABL que é o diagnóstico para a leucemia mielogénica crónica (CML). Esses reagentes de cromossomas específicos para o diagnóstico de CML contêm sequências de ácido nucleico que são substancialmente homólogas a sequências cromossómicas na proximidade de regiões de interrupção de translocação de regiões cromossómicas 9q34 e 22q11 associadas com a CML.

Os referidos reagentes produzem um aspecto de manchamento que é distintamente alterado quando ocorre a fusão de BCR-ABL característica de CML. A Figura 11 demonstra graficamente vários aspectos de manchamento que, juntamente com outros aspectos de manchas potenciais, se alteram na presença de um rearranjo genético, tal como a fusão de BCR-ABL.

A presença de um rearranjo genético pode ser determinada por meio de aplicação dos reagentes da presente invenção de acordo com os métodos aqui descritos e observando a proximidade e/ou outras características dos sinais dos aspectos de manchas produzidas.

De preferência, os reagentes de cromossomas específicos usados para detectar a CML da presente invenção compreendem sequências do ácido nucleico com uma complexidade compreendida entre cerca de 50 quilobases (kb) e cerca de megabase (Mb), mais preferencialmente de cerca de 50 kb e cerca de 750 kb, e ainda de maior preferência entre cerca de 200 kb e cerca de 400 kb.

A presente invenção proporciona ainda métodos de distinção entre rearranjos genéticos suspeitos que ocorrem numa proximida-

de relativamente curto de um genoma, em que os reagentes do cromossoma específicos compreendem sequências de ácido nucleico substancialmente homólogas a sequências de ácido nucleico nas proximidades dos referidos rearranjos genéticos suspeitos. Um exemplo de uma tal diferenciação entre dois rearranjos genéticos potenciais é o diagnóstico diferencial da CML da leucemia linfocítica aguda (ALL).

A presente invenção proporciona ainda métodos e reagentes para a produção de aspectos de manchamentos num paciente atingido por uma doença associada a um rearranjo genético, tais como as associadas com a fusão do BCR-ABL na CML, em que os referidos aspectos de manchamento produzem e/ou são indicativos da resposta de um paciente a vários regimes terapêuticos, tais como a quimioterapia, radiações, cirurgia, e transplante, tal como o transplante da medula do osso. Os referidos aspectos de manchamento podem ser úteis para controlar o estado do referido paciente, de preferência numa base de célula após células e pode ser prenúncio de uma repetição de uma doença de um paciente que se encontra em remissão. A análise microscópica auxiliada por computador pode ajudar na interpretação de aspectos de manchamentos da presente invenção, e a presente invenção proporciona métodos em que a análise microscópica auxiliada por computador é usada para testar células de pacientes numa base de células após célula, por exemplo, para pesquisar a doença residual num paciente.

A presente invenção proporciona ainda métodos e reagentes para determinar a base molecular da doença genética, e para detectar doenças específicas geneticamente baseadas.

A presente invenção proporciona ainda métodos e reagentes para detectar síndromas genéticos contíguos que compreende a hibridização in situ de amostras de ácido nucleico que compreende

sequências que são substancialmente homólogas a sequências de ácido nucleico características de um ou mais componentes de um síndrome genético contíguo. É representativo de um tal síndrome genético contíguo o síndrome de Down.

Também se proporcionam métodos para detectar simultaneamente rearranjos de locais múltiplos num genoma, que compreende a hibridização in situ de amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, que compreendem sequências de ácido nucleico que são substancialmente homólogas a sequências de ácido nucleico em locais múltiplos num genoma.

Proporcionam-se ainda métodos para a pesquisa de rearranjos genéticos num genoma. Por exemplo, a análise de bandas convencional pode indicar uma anormalidade numa região cromossômica de um genoma em exame. Os métodos da presente invenção podem incluir a aplicação de amostras de ácido nucleico, produzidas a partir das proximidades da referida região cromossômica de um genoma normal, por meio de hibridização in situ a células que contêm a anormalidade para determinar em pormenor a localização exacta e o tipo de rearranjo genético da referida anormalidade pela observação dos aspectos de manchamento assim produzidos.

A presente invenção proporciona ainda amostras de ácido nucleico de elevada complexidade que foram optimizadas para a detecção rápida, eficiente e automatizada de rearranjos genéticos.

Uma das formas de produzir uma amostra de elevada complexidade é juntar vários ou muitos clones, por exemplo, clones de fajo, de plasmídeo, cosmídeo e/ou JAC, entre outros, em que cada um dos clones contém uma inserção que seja capaz de hibridizar nalguma parte do sinal num genoma. Uma outra forma de produzir essa amostra é usar a reacção de cadeia de polimerase (PCR).

Heterogéneo em referência à mistura dos fragmentos de ácido nucleico marcados significa que os reagentes de coloração compreendem muitas cópias de cada um dos fragmentos que têm sequências e/ou tamanhos diferentes (por exemplo dos clones de ADN diferentes juntos para fazer a amostra). Ao serem preparados para ser usados, estes fragmentos podem ser cortados, ao acaso ou especificamente, a fim de ajustar a distribuição do tamanho dos troços de ácido nucleico que participa na reacção de hibridização.

Tal como se discute em maior pormenor abaixo, de preferência as misturas de amostras heterogéneas são substancialmente livres de sequências de ácido nucleico com capacidade de hibridização para ácido nucleico não-objectivo. Uma grande parte das referidas sequências ligam-se a sequências repetitivas que são partilhadas pelos ácidos nucleicos alvos e não-alvos, quer dizer, sequências repetitivas partilhadas.

Os métodos para remover as sequências de ácido nucleico não desejadas e/ou para inutilizar a capacidade de hibridização das referidas sequências são discutidas em maior pormenor abaixo [Veja secção II]. Os referidos métodos incluem, mas não estão limitados à remoção selectiva ou selecção de sequências repetitivas partilhadas de amostra; a selecção cuidada das sequências de ácido nucleico para a inclusão na amostra; ao bloqueamento de sequências repetitivas partilhadas por meio de adição de ADN genómico não marcado ou seleccionado mais cuidadosamente sequências de ácido nucleico para inclusão na mistura de bloqueamento; à incubação de mistura de amostra durante um tempo suficiente para a reassociação de sequências repetitivas de elevada cópia, ou semelhantes.

De preferência, os reagentes de coloração da presente invenção são aplicados ao ADN cromossómico de interfase ou metafase

pela hibridização in situ, e os cromossomas são identificados ou classificados, i. e., cariotipados pela detecção da presença de marca, tal como a biotina ou 3H, nos fragmentos de ácido nucleico que compreendem o reagente de coloração.

A presente invenção inclui reagentes de cromossomas de coloração para o complemento genómico total de cromossomas reagentes de coloração específicos de cromossomas únicos, reagentes de coloração específicos para sub-grupos de cromossomas e reagentes de coloração específicos para sub-regiões dentro de cromossomas únicos ou múltiplos. O termo "cromossoma específico" entende-se que engloba todas estas formas de realização dos reagentes de coloração feitos de e dirigidos contra os tipos de cromossomas normais e anormais.

Um método preferido de fazer os reagentes de coloração de cromossomas específicos da presente invenção inclui: 1) o isolamento de ADN cromossómico de um tipo de cromossoma em particular ou de uma região ou regiões alvo no genoma; 2) a amplificação do ADN isolado para formar uma mistura heterogênea de fragmentos ácido nucleico; 3) impossibilitar a capacidade de hibridização de ou remover sequências repetitivas partilhadas nos fragmentos de ácido nucleico e 4) marcar os fragmentos de ácido nucleico para formar uma mistura heterogênea de fragmentos de ácido nucleico marcados. Tal como se descreve mais pormenorizadamente abaixo, a ordem das fases para as formas de realização particulares varia de acordo com os meios particulares adotadas para levar a cabo as fases.

A presente invenção dirige-se a problemas associados com a cariotipagem de cromossomas em especial para aplicações de diagnóstico e dosimétricas. Em particular, a presente invenção ultrapassa problemas que surgem devido à falta de manchas que sejam suficientemente específicas de cromossomas, proporcionan-

do reagentes que compreendem misturas heterogêneas de fragmentos de ácido nucleico que possam ser hibridizadas para o ADN e/ou alvo, por exemplo os cromossomas de sinal, os sub-conjuntos alvo de cromossomas ou as regiões alvo de cromossomas específicos. A técnica de coloração da presente invenção abre a possibilidade de detecção rápida e altamente sensível de anormalidades cromossômicas, em particular, rearranjos genéticos, nas células de metafase e interfase usando equipamento clínico e laboratorial padrão e a análise melhorada usando técnicas automatizadas. Tem aplicação directa na selecção genética no diagnóstico do cancro e na dosimetria biológica.

A presente invenção proporciona ainda especificamente, métodos e amostras de ácido nucleico para colorir material cromossômico de fetos, quer seja condensado, tal como em metafase, ou disperso tal como em interfase. Ainda a presente invenção proporciona um método invasivo não-embriónico de cariotipação do material cromossômico de células de fetos, em que as células de fetos forem separadas do sangue materno. As referidas células de fetos são de preferência leucócitos e/ou citotrofóblastos. Exemplos de amostras de ácido nucleico são as amostras de elevada complexidade específicas de cromossomas para os tipos de cromossoma 13, 18 e/ou 21. Amostras representativas compreendem as bibliotecas de plasmídeo de Bluescribe específicas de cromossomas, das quais foi removido um número suficiente de sequências repetitivas partilhadas ou cuja capacidade de hibridização foi anulada antes de e/ou durante a hibridização com os cromossomas dos fetos pretendidos.

A presente invenção proporciona ainda estojos para a realização de ensaios que compreendem amostras de ácido nucleico apropriadas para serem usadas em citogenéticos de tumores, na detecção de locais relacionados com a doença, na análise de anormalidades estruturais, por exemplo, translocações, entre ou-

— tros rearranjos genéticos, e para a dosimetria biológico.

A presente invenção proporciona ainda estojos de selecção pré-natal que compreendem amostras de ácido nucleico apropriadas da presente invenção. A presente invenção proporciona também estojos para a realização de ensaios que compreendem amostras de elevada complexidade para a detecção de rearranjos genéticos e, em especial para os que produzem a fusão BCR-ABL característica de CML.

Os métodos e as composições da presente invenção permitem a coloração de material cromossómico com meios apropriados para uma aplicação desejada.

O modelo pode estender-se sobre algumas regiões de um ou mais cromossomas ou sobre alguns ou todos os cromossomas de um genoma e pode compreender secções distinguíveis múltiplas, distinguíveis, por exemplo, por cores múltiplas. Alternativamente, o modelo por focar um troço em particular ou troços em particular de um genoma, tais como um troço ou troços contendo potencialmente uma anulação ou um ponto de interrupção que seja diagnóstico ou prognosticamente importante em relação a um ou mais tumores, ou naqueles troços de cromossomas que tenham significado para o diagnóstico pré-natal.

Os modelos de manchamento podem ser ajustados para o método de análise empregue, por exemplo, quer por um observador humano ou por um equipamento automatizado, tal como centímetros de passagem ou microscopia auxiliada por computador. Os modelos podem ser escolhidos para serem apropriados para a análise de cromossomas condensados ou de material cromossómico disperso.

— A presente invenção proporciona ainda meios automatizados para detectar e analisar anormalidades cromossómicas, em particular rearranjos genéticos, tal como indicado pelos modelos de man-



chas produzidas de acordo com a presente invenção.

Um outro objecto da presente invenção consiste em proporcionar um método alternativo às técnicas correntemente disponíveis para preparar e aplicar amostras de hibridização de ADN de cadeia única não-auto-complementares.

Um outro objectivo da presente invenção consiste em melhorar as proporções sinal-para-barulho atingível na hibridização *in situ* por meio de redução de ligação não específica e não combinada da amostra.

Um outro objectivo da presente invenção consiste em proporcionar um método de desnaturação do ADN de cadeia dupla alvo, para a aplicação de amostra de hibridização que minimiza regiões de cadeia única disponíveis para a hibridização que são não complementares às sequências de amostra.

Fragments de ADN a partir dos quais se podem construir amostras tratando com uma endonuclease de restrição que gera uma colecção de fragmentos de restrição com extremidades "tenazes" ou cortes em ziguezague característicos da endonuclease usada. Quer dizer, as duas extremidades de fragmentos introduzidas por um corte cada uma, consistem numa cadeia saliente e numa cadeia retraída. Os fragmentos de restrição são inseridos em vectores que foram feitos de modo a aceitar esse tipo de fragmento de restrição; e os vectores são transferidos para organismos hospedeiros que são desenvolvidos para aumentar o número de fragmentos de restrição. Em seguida, os vectores são separados dos organismos hospedeiros e os fragmentos de restrição são encisados e separados dos vectores. Em cada uma das extremidades dos fragmentos de restrição as cadeias retraídas são digeridas por meio de uma exonuclease apropriada. Não é permitido que a digestão se complete. Os fragmentos de restri-

ção tratados por exonuclease são depois usados como modelos primários para a ADN-polimerase, que substitui a cadeia digerida na presença de um precursor sinalizado. Exemplos de enzimas apropriados para este processo são a exonuclease III seguida de um tratamento com o fragmento grande de ADN-polimerase I; ou o I_4 ADN-polimerase, que pode desempenhar as duas funções por alteração das condições reaccionais. Depois de a síntese estar completa, os fragmentos de restrição são cortados em fragmentos mais pequenos de modo a que as porções sinalizadas do fragmento de restrição original permaneça substancialmente intacto. Os fragmentos mais pequenos são desnaturados e as cadeias sinalizadas são separadas das cadeias não-sinalizadas para formar as amostras de hibridização.

De acordo com este método de usar amostras de cadeia única, antes da aplicação da amostra de hibridização para o ADN alvo, o ADN alvo é primeiro tratado com a mesma endonuclease de restrição usado para excisar o ADN amostra do vector de clonação. Este tratamento corta o ADN alvo numa colecção de fragmentos de restrição tendo caudas em cada extremidade característicolas de endonuclease de restrição. Em seguida, o ADN alvo é tratado com uma exonuclease que remove a cadeia retraída, expondo deste modo o ADN de cadeia única na proximidade do corte introduzido pelo endonuclease de restrição. Finalmente, a amostra de hibridização é aplicada ao ADN alvo, por exemplo, usando protocolos de hibridização in situ padrão, tal como se descreve mais pormenorizadamente abaixo.

Uma característica importante do método de amostra de cadeia única é o tratamento da amostra de ADN clonado e do ADN alvo com a mesma endonuclease de restrição. Isto permite que o ADN de cadeia única do alvo seja complementar à cadeia sinalizada de amostra. Naturalmente, muitos segmentos do sinal em adição com os sítios de ligação correctos serão tornados de cadeia

única uma vez que existem muitos cortes de restrição, mas haverá muito menos sinais de cadeia única totais do que seriam feitos pela desnaturação indiscriminada. Em adição, o ADN alvo tornado de cadeia única desta forma não se pode reanelar consigo próprio e deste modo bloquear o acesso à amostra.

Uma outra característica importante (mas não crítica) desse método é a selecção de uma marca que permita a separação de cadeias marcadas de cadeias não marcadas. De preferência, os percursores são marcados por biotinilação e as cadeias marcadas são separadas das cadeias não marcadas por meio de cromatografia de afinidade.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A, B e C e as Figuras 2A e 2B ilustram a hibridização de uma livreria 21 de cromossomas específicos da sequência de metafase humana, em que as reserções foram clonadas em fase Lambda "Charon 21A. A capacidade de hibridização das sequências repetitivas de cópias elevadas na livreria foi reduzido pela adição de ADN genómico não sinalizado para a mistura de hibridização. A amostra foi marcada com biotina que foi detectada com avidina de FITC verde (isotiocianato de avidina de fluorescência). Todo o ADN nos cromossomas foi colorido com a tinta fluorescente azul DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol).

A Figura 1A é uma imagem binária de mancha DAPI na sequência de metafase humana obtida usando uma câmara de TV ligada a um microscópio fluorescente. Foram usados filtros apropriados para a visualização DAPI. O processamento por computador da imagem mostra todos os troços acima de uma intensidade limiar es-

colhida como branco, e o resto como preto.

A Figura 1B é uma imagem binária da mancha FITC da mesma sequência de metáfase humana tal como na Figura 1A. A imagem foi processada tal como na Figura 1A, mas o filtro foi alterado no microscópio de forma a que o FITC ligado à amostra ficasse visível e não o DAPI.

A Figura 1C é uma imagem binária do cromossoma 21s sozinho, tendo os objectos não especificamente manchados (que são mais pequenos) sido removidos por técnicas de processamento de imagem padrão na imagem binária de Figura 1B.

A Figura 2A é uma fotografia a cores de mancha DAPI numa sequência de metáfase humana que foi preparada e hibridizada ao mesmo tempo que a sequência mostrada nas imagens binárias geradas por computador das Figuras 1A, B e C.

A Figura 2B é uma fotografia a cores de fluoresceína ligada à amostra de ADN na mesma sequência de metáfase humana tal como se mostra na Figura 2A. Foi obtido mudando os filtros no microscópio fluorescente para fazer sobressair a fluoresceína mais do que a DAPI. A fotografia é comparável à imagem binária da Figura 1B.

A Figura 3 é uma fotografia de uma sequência de metáfase humana preparada e hibridizada ao mesmo tempo que as sequências mostradas nas Figuras 1A, B e C e 2A e B. Os processos usados foram os mesmos com excepção de se ter usado PI (iodeto de propídio) em vez de DAPI para colorir todos os cromossomas. Quer as manchas de PI quer as manchas de fluoresceína podem ser vistos com os mesmos filtros de microscópio. Foi usada película a cores de forma a que o negativo de mancha de iodeto de propídio apareça vermelho e a fluoresceína da amostra apareça amarela na película a cores.

A Figura 4A mostra a hibridização de biblioteca específica do cromossoma 4 em plasmídeos Bluescribe (a biblioteca pBS-4) para uma sequência de metafase humana em que não foi usada qual ADN genómico humano não marcado e em que a mistura de hibridização foi aplicada imediatamente depois da desnaturação. Ambas as cópias do cromossoma 4 são vistas como ligeiramente mais claras do que os outros cromossomas. As pequenas setas indicam regiões que não estão manchadas com a amostra. Tal como na Figura 3 e no resto das Figuras abaixo, o PI é o negativo de manchas e a fluoresceína é usada para marcar a amostra.

A Figura 4B mostra a hibridização do pBS-4 para uma sequência de metafase humana em que foi usado ADN genómico humano não marcado durante a hibridização (Q=2 de ADN genómico; o significado de Q é explicado abaixo). A análise de imagem quantitativa mostra que a intensidade por unidades de comprimento do cromossoma 4s é de cerca de 20 X a dos outros cromossomas. Os cromossomas 4s são amarelos; os outros cromossomas são vermelhos devido à contra mancha de iodeto de proídio. Foram usadas duas camadas de isotiocianato de avidina-fluoresceína para tornar os cromossomas alvo suficientemente claros para se medirem com exactidão. No entanto, os cromossomas número 4 podem ser facilmente reconhecidos depois de ser aplicada uma camada única.

A Figura 4C mostra a mesma sequência tal como na Figura 4B mas através de um filtro que apenas passa a fluorescência do isotiocianato de fluoresceína.

A Figura 4D mostra a detecção de uma translocação provocada por radiação (setas envolvendo o cromossoma 4s numa sequência de metafase humana em que são usadas livrarias pBS-4 específicas. A proporção de contraste é de cerca de 5 x.

A Figura 4E mostra que cromossomas normais e dois cromossomas

derivados resultantes de uma translocação entre o cromossoma 4 e 11 (na linha de células RS4;11) podem ser detectados pelas composições e métodos da presente invenção nos núcleos de interfase. Aparecem como três domínios distintos.

A Figura 4F mostra a hibridização da biblioteca específica do cromossoma 21 em plasmídeo de Bluescribe (a livreria pBS-21) para uma sequência de metafase da linha de células de trisomia 21. É visível uma pequena quantidade de hibridização perto dos centrômeros dos outros cromossomas acrocêntricos.

A Figura 4G mostra a mesma hibridização que na Figura 4F mas com núcleos de interfase. Estão claramente mostrados os três domínios do cromossoma 21.

A Figura 4H mostra a hibridização com uma mistura de 120 amostras de cópia única do cromossoma 4 para uma sequência de metafase humana. Os cromossomas número 4 são indicados por setas.

A Figura 5 mostra a hibridização de um cromossoma artificial de fermentação (MAC) clono contendo uma inserção de 580 kb de ADN humano para uma sequência de metafase humana. É visível uma banda de fluoresceína amarela em cada um dos cromossomas 12s (a 12q21.1) contra a contramancha de iodo de propídio.

A Figura 6 mostra a hibridização de ADN de uma célula hibridizada humana/criceto contendo uma cópia de cromossoma 19 humano para uma sequência de metafase humano. Um pouco para a direita do centro de fotografia encontram-se os dois cromossomas 19s que são mais claros do que os outros cromossomas da sequência.

A Figura 7 ilustra um método representativo do uso de reacção de cadeia de polimerase (PCR) para produzir amostras da presen-

te invenção que são reduzidas em sequências repetitivas.

A Figura 8 ilustra as localizações das amostras para o ponto de interrupção CML e o aspecto de manchamento correspondente em ambos os núcleos normais e de metafase e interfase de CML.

A parte esquerda mostra representações esquemáticas do gene BCR no cromossoma 22, o gene ABL do cromossoma 9 e o gene de fusão BCR-ABL no cromossoma de Philadelphia. Também se mostram as localizações dos pontos de interrupção de CML e a sua relação com as amostras (32). A direita mostra os aspectos de hibridização esperados para as amostras c-hu-ABL e PHL12, para as sequências normais e de metafase de CML e para os núcleos de interfase.

A Figura 9 mostra a hibridização de fluorescência in situ (FISH) em sequências de metafase e núcleos de interfase. Os painéis A e B mostram a hibridização ABL e BCR para as sequências de metafase normais. O sinal ABL (A) é localizado para o troço tetomérico de 9q o sinal BCR (B) é localizado perto do centrômero de 22q. O painel C mostra que o manchamento de ABL está localizado na região telomérica do cromossoma de Philadelphia num caso de CML com 46 xY,t (9:22) (q³⁴;q11). O painel D mostra que o manchamento de ABL é intersticial no cromossoma derivado 22 resultante de um acontecimento de inserção no caso de CML com 46xl ins (22:9) (q11;q34). O painel E ilustra que a linha de células K562 apresenta sinais múltiplos localizados numa região do núcleo de interfase. Foi visto um aspecto de manchamento idêntico com a amostra BCR indicando a amplificação do gene da fusão BCR-ABL. O painel F apresenta uma sequência de metafase de linha de células K562 mostrando a amplificação do gene de fusão localizado num cromossoma único.

A Figura 10 ilustra a hibridização de fluorescência in situ em núcleos de CML de interfase com amostras ABL (vermelhas) e BCR

(verdes) visualizadas simultaneamente através de um filtro de passagem de banda dupla. As células de um paciente com CML mostram os sinais verde vermelho (amarelo) resultantes da hibridização no gene de fusão BCR-ABL e os sinais de hibridização de vermelho e verde únicos nos genes BCR e ABL normais nos cromossomas 22 e 9.

A Figura 11 ilustra algumas estratégias de amostras exemplares para a detecção de aberrações estruturais. O desenho do modelo de manchamento, as cores etc, de amostra podem ser optimizadas para a detecção de anormalidades genéticas em células de metafase e/ou interfase diferentes padrões (aspectos) podem ter vantagens para aplicações particulares. Os desenhos na Figura 11 ilustram alguns dos modelos de manchamento para a detecção de algumas anormalidades. Os exemplos são representativos e não pretendem ser exaustivos; podem ser combinados diferentes padrões para permitir a detecção de anormalidades múltiplas na mesma célula.

Nos desenhos de Figura 11, os cromossomas de metafase são mostrados com a amostra ligada a ambos os cromatídios. Os núcleos de interfase são pintados para estarem num estágio do ciclo de célula antes da réplica do troço do cromossoma a que a amostra se liga; deste modo, existe apenas um cromatídio para cada cromossoma de interfase. Quando a ligação de amostra se restringe apenas a uma porção do cromossoma, o sinal é indicado ou como círculo branco ou como círculo preto. A referida representação é empregue para indicar cores diferentes ou características de coloração de outra forma distinguíveis. Os padrões que contêm mais de duas características distinguíveis (três cores, proporções de cores diferentes, etc.) permitem aspectos de manchamento mais complexos do que os que foram ilustrados. As localizações cromossómicas das regiões de interrupção no ADN estão indicadas com linhas horizontais junto aos cromossomas anormais.

a. A Secção a) apresenta o uso de uma amostra que mancha um cromossoma na sua totalidade. A referida amostra pode ser usada para detectar uma translocação que ocorra em qualquer lugar no cromossoma. A fotografia a cores da Figura 12 mostra o uso da referida mancha para o cromossoma 22 para detectar uma translocação neste caso que ocorre com CML. Uma tal aproximação de manchamento não é muito útil nos núcleos de interfase uma vez que a região do núcleo que é manchada é relativamente grande; sobreposições nas regiões manchadas podem tornar a interpretação difícil em muitos núcleos.

b. A Secção b) representa a redução de região manchada do cromossoma mostrado em a) em relação ao de proximidade da região de interrupção, com a condição de que a informação se focasse em acontecimentos nessa região. Este aspecto de manchamento pode ser contínuo ou descontínuo ao longo da região de interrupção, apenas para que fique alguma ligação em ambos os lados da região de interrupção. O referido aspecto de manchamento requiere apenas uma "COR" mas não de qualquer informação acerca de outras regiões genómicas que possam estar envolvidas na permutação.

c. A Secção c) representa o uso de uma amostra que se liga a sequências que chegam juntas como resultado do rearranjo e que permitem a detecção nas células de metafase e interfase. Neste caso, as diferentes sequências são manchadas com "Cores" diferentes. O referido aspecto de manchamento é o usado nos exemplos de Secção VIII do presente pedido de patente.

d. A Secção d) representa uma extensão de c) incluindo manchamento de ambos os lados de ambas as regiões de interrupção envolvidas no rearranjo. Tal como se indicou, são usadas "cores" diferentes. A informação adicional fornecida pelo aspecto de manchamento mais complexo pode auxiliar com a inter-

pretação dos núcleos. Poderá também permitir o reconhecimento de um resultado de inserção aparente tal como aqui se refere.

e. A Secção e) representa a detecção de uma inversão num homólogo de um cromossoma.

f. A Secção f) representa um padrão de manchamento útil na detecção de uma anulação. Uma anulação pode também ser detectada com uma amostra que mancha apenas a região anulada; contudo, a falta de ligação da amostra pode ser devida a razões diferentes de anulação de sequência pretendida. As regiões de flanqueamento manchadas com uma "cor" diferente servem como controlos para a hibridização.

A Figura 12 ilustra um aspecto de manchamento para detectar um rearranjo manchando um cromossoma na sua totalidade, neste caso um rearranjo do cromossoma 22 associado com CML. A sequência de metafase desta figura é de uma célula CML que foi manchada com uma amostra que se liga ao longo de todo o cromossoma 22. Os troços de amostra pintados aparecem amarelos. O resto do ADN foi manchado com a mancha química vermelho fluorescente de iode de propídio. O cromossoma totalmente amarelo é uma cópia normal do cromossoma 22. Imediatamente abaixo do referido cromossoma normal 22 fica o cromossoma de Philadelphia, um cromossoma com uma pequena parte amarela e uma parte vermelha. Abaixo e para a direita do cromossoma de Philadelphia fica o cromossoma anormal 9 (vermelho) com a parte distal do cromossoma 22 (amarelo) ligada. A fotografia desta figura ilustra o aspecto de manchamento representado na parte a) da figura anterior.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao uso de amostras de ácido nucleico para a coloração de material cromossômico sinalizado em modelos que se podem estender ao longo de um ou mais cromossomas totais, e/ou ao longo de um ou mais troços em um ou mais cromossomas incluindo modelos que se estendam sobre um genoma completo. Os agentes de coloração da presente invenção facilitam a identificação microscópica e/ou de citometria de passagem dos cromossomas normais e aberrantes e ajuda na caracterização de natureza genética de anormalidades particulares tais como os rearranjos genéticos.

O termo "específico de cromossomas" é aqui definido para englobar os termos "sinal (alvo) específico" e "região (troço) específica", quer dizer, quando a composição de coloração é dirigida a um cromossoma é "específica de cromossoma", mas é também específica de cromossomas quando é dirigida, por exemplo, a regiões múltiplas em múltiplas cromossomas, ou apenas a uma região de apenas um cromossoma, ou regiões, ao longo de todo o genoma. O termo específico de cromossomas teve como origem o uso de bibliotecas de ADN recombinantes feitas de ADN de coloração a partir de um único tipo de cromossoma normal como material fonte para as amostras iniciais da presente invenção. As bibliotecas feitas de ADN de regiões de um ou mais cromossomas são fontes de ADN para amostras para essa região ou regiões do genoma. As amostras produzidas desse material fonte são amostras específicas de troços mas também estão englobadas dentro da frase mais ampla amostras "específicas de cromossomas". O termo "específico de sinal", e impermutavelmente aqui usado com o termo "específico de cromossomas".

A palavra "específico" tal como é normalmente usada na técnica tem duas significações algo diferentes. Aqui segue-se a prática

ca. "Específico" pode referir-se à origem de uma sequência de ácido nucleico ou ao padrão com o qual se vai hibridizar para um genoma como parte de um reagente de coloração. Por exemplo, o isolamento e a coloração de ADN a partir de um cromossoma específico resulta numa "livraria específica de cromossomas".

[Ex., van Dilla et al., "Human Chromosome-Specific DNA Libraries: Construction and Availability", Biotechnology, 4:537 (1986)].

Contudo, a referida livraria contém sequências que são partilhadas com outros cromossomas. As referidas sequências partilhadas não são específicas de cromossomas em relação ao cromossoma a partir do qual derivaram nas suas propriedades de hibridização uma vez que se vão ligar a mais do que o cromossoma de origem. Uma sequência é "específica de cromossoma" se se ligar apenas ao troço desejado de um genoma. Essas sequências incluem sequências de cópia única contidas no sinal ou nas sequências repetitivas, em que as cópias estão contidas predominantemente no sinal.

"Específico de cromossomas" na modificação do "reagente de coloração" refere-se ao aspecto (padrão de hibridização em geral das sequências de ácido nucleico que compreendem o reagente. Um reagente de coloração é específico de cromossomas se se conseguir um contraste útil entre o material cromossómico alvo e não-alvo (quer dizer que o alvo possa ser adequadamente visualizado).

Uma amostra é aqui definida como sendo uma colecção de fragmentos de ácido nucleico cuja hibridização para o sinal (alvo) possa ser detectada. A amostra é marcada tal como se descreve abaixo de forma a que a sua ligação ao sinal possa ser visualizada. A amostra é produzida a partir de alguma fonte de sequências de ácido nucleico, por exemplo, uma colecção de clones ou uma colecção de produtos da reacção de cadeia de polimerase (PCR). A fonte de ácido nucleico pode depois ser pro-

Wifaria

cessada de alguma maneira, por exemplo, por remoção de sequências repetitivas ou bloqueando-as com ácido nucleico não sinalizado com uma sequência complementar, de forma a que a hibridização com a amostra resultante e produza uma coloração com contraste suficiente no alvo (sinal). Deste modo, a palavra amostra pode aqui ser usada para referir não apenas o ácido nucleico detectável, mas também o ácido nucleico detectável na forma em que é aplicado ao sinal, por exemplo, com o ácido nucleico de bloqueamento, etc. O ácido nucleico de bloqueamento pode também ser mencionado separadamente.

O significado específico do termo "amostra" deverá ser claro a partir do contexto em que a palavra é usada.

Quando duas ou mais amostras de ácido nucleico são misturadas conjuntamente, produzem uma nova amostra a qual, quando é hibridizada para um sinal de acordo com os métodos da presente invenção, produz um aspecto de manchamento que é uma combinação das amostras de manchamento individualmente produzidas pelas amostras componentes da mesma. Deste modo, os termos "amostra" e "amostras" (quer dizer as formas no singular e no plural) podem ser usadas interpermutavelmente dentro do contexto de um aspecto de manchamento produzido. Por exemplo, se uma amostra da presente invenção produzir um ponto no cromossoma 9, e outra amostra produzir uma banda no cromossoma 11, as duas amostras conjuntamente formam uma amostra que produz um aspecto (padrão) de manchamento ponto/banda.

O termo "marcado" é aqui usado para indicar que existe algum método de visualizar a amostra ligada, quer a amostra contenha ou não directamente algum constituinte modificado. A Secção III abaixo descreve vários meios de marcação directa da amostra e outros meios de marcação através dos quais a amostra limite pode ser detectada.

Os termos "mancha" ou "coleção" são aqui definidos para significar a hibridização de uma amostra da presente invenção para um genoma ou um segmento do mesmo, de forma a que a amostra se ligue de forma segura e digna de confiança ao material cromossômico sinalizado no mesmo e a amostra limite seja capaz de ser visualizada. Os termos "manchamento" ou "coloração" são usados interpermutavelmente. Os padrões que resultam do "manchamento" ou "coloração" são úteis para a análise citogenética, mais particularmente, para a análise citogenética molecular. Os (padrões) aspectos de manchamento facilitam a identificação citométrica microscópica e/ou de passagem de cromossomas normais e anormais e a caracterização de natureza genética de anormalidades particulares. A Seção III abaixo descreve métodos para tornar a amostra visível. Uma vez que existem múltiplos métodos compatíveis de visualização da amostra, os padrões de manchamento dos diferentes componentes de amostra podem ser distinguidos, por exemplo, por meio de cores. Deste modo, a presente invenção tem a capacidade de produzir qualquer padrão (aspecto) de manchamento desejado nos cromossomas visualizados com uma ou mais cores (um padrão de manchamento multicolor) e/ou outros métodos indicadores. O termo "manchamento" tal como aqui é definido não inclui o conceito de cromossomas de manchamento com químicos, tal como nos métodos de carotipação convencionais, embora essas manchas convencionais possam ser usadas em conjunto com as amostras da presente invenção para permitir a visualização das partes do genoma em que a amostra não se liga. O uso de DAPI e de iodeto de propídio para esse fim é ilustrado nas figuras.

A frase "elevada complexidade" é aqui definida para significar que a amostra, assim modificada, contém na ordem de 50 000 (50 kb) ou mais até muitos milhões ou vários bilhões, de bases de sequências de ácido nucleico que não são repetidas na amostra. Por exemplo, as amostras de ácido nucleico de elevada com-

Wifaria⁴²

plexidade representativas da presente invenção podem ter uma complexidade superior a 50 kb, superior a 100 000 bases (100 kb), superior a 200 000 bases (200 kb), superior a 500 000 bases (500 kb), superior a um milhão de bases (1 mb), superior a 2 Mb, superior a 10 mb, superior a 100 mb, superior a 500 Mb, superior a 1 bilião de bases e ainda superior a vários biliões de bases.

O termo "complexidade" é aqui definido de acordo com o padrão para a complexidade do ácido nucleico tal como estabelecido por Britten et. al., Methodo of Enzymol., 29:363 (1974); Veja-se também Cantor and Schimmel, Biophysical Chemistry: Part III: "The Behavior of Biological Macromolecules", em 1228-1230 (Freeman and Co. 1980) para mais explicações e exemplificação de complexidade do ácido nucleico.

A complexidade preferida para uma composição de amostra da presente invenção está dependente da aplicação para a qual é designada. Em geral, quanto maior for a área de sinal (área alvo) mais complexa será a amostra. Diga-se desde já que a complexidade de uma amostra necessária para produzir um padrão de marcas desejado num cromossoma diminuirá à medida que aumentar a sensibilidade da hibridização, uma vez que o progresso é feito na tecnologia de hibridização. À medida que a sensibilidade aumentar, aumentará a segurança e confiança do sinal proveniente de sítios do alvo mais pequenos. Deste modo, enquanto que presentemente pode ser necessária uma sequência de sinal de cerca de 40 kb a cerca de 100 kb para proporcionar um sinal seguro e digno de confiança e facilmente detectável, no futuro sequência de sinal mais pequenas proporcionarão sinais dignos de confiança. Consequentemente, à medida que a sensibilidade de hibridização aumentar, uma amostra com uma certa complexidade por exemplo 100 kb, deverá permitir ao utilizador detectar de forma considerável mais locais num genoma do que

os que são agora detectados de forma segura; deste modo, será obtido mais informação com uma amostra da mesma complexidade. O termo "complexidade" refere-se por isso à complexidade da amostra total independentemente do número de locais visualmente distintos que possam ser detectados, quer dizer, independentemente da distribuição dos sítios alvo no genoma.

Tal como se indicou acima, com as técnicas de hibridização correntes é possível obter um sinal facilmente detectável e digna de confiança com uma amostra de cerca de 40 kb a cerca de 100 kb (por exemplo, a capacidade de inserção na amostra de um ou alguns cosmídios) sinalizada para um ponto compacto no genoma. Assim, por exemplo, uma complexidade na gama de aproximadamente 100 kb permite agora a hibridização de ambos os lados de uma translocação específica de tumores. O troço de amostra sinalizado para um lado da região de interrupção pode ser marcada de forma diferente da do sinalizado do outro lado da região de interrupção a fim de que ambos os lados possam ser diferenciados com diferentes cores, por exemplo. Proporcionalmente, o aumento de complexidade de amostra permite a análise de regiões compactas múltiplas do genoma simultaneamente. Os padrões de bandas convencionais produzidos pelas manchas químicas podem ser substituídos, de acordo com a presente invenção com uma série de pontos de referência com base na amostra, codificado com as cores (por exemplo), ao longo de cada cromossoma ou de regiões significativas do mesmo.

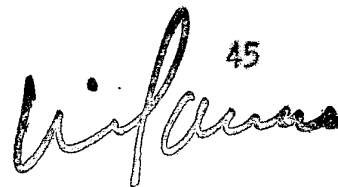
A coloração uniforme de uma região contígua alongada de um genoma, por exemplo, um cromossoma completo, requiere uma complexidade de amostra proporcional à, mas não substancialmente inferior a, complexidade de região alvo. A complexidade requerida é apenas a necessária para proporcionar um sinal substancialmente uniforme e seguro no alvo. A Secção V.B, abaixo, demonstra que a coloração fluorescente do cromossoma humano

21, que contém cerca de 50 megabases (Mb) de ADN, é suficiente com uma complexidade de amostra de cerca de 1 Mb. A Figura 4H ilustra a hibridização de cerca de 400 kb de amostra para o cromossoma humano 4, que contém cerca de 200 Mb of ADN. Nesse caso, são visíveis falhas entre a hibridização dos elementos individuais de amostra. As Figuras 4B e 4F demonstram os resultados atingidos com amostras feitas de livrarias inteiras para os cromossomas 4 e 21, respectivamente. Os cromossomas são manchados de uma forma muito mais densa tal como se mostra nas Figuras 4B e 4F do que com a amostra de menor complexidade que compreende sequências de ácido nucleico de cópia única usada para produzir o padrão da Figura 4H.

O aumento da complexidade além do mínimo requerido para a coloração adequada não é prejudicial, contanto que a concentração de ácido nucleico total na amostra permanece abaixo do ponto em que a hibridização é reduzido. A diminuição na concentração de uma porção de uma sequência na amostra é compensada pelo aumento do número de sítios de sinais (sítios alvo). Com efeito, quando se usam amostras de cadeia dupla, torna-se preferido manter uma concentração relativamente baixa de cada porção da sequência para inibir a reassociação antes da referida porção de sequência poder encontrar um sítio de ligação no sinal.

Os modelos de manchamento da presente invenção compreendem uma ou mais "bandas". O termo "banda" é aqui usado como ponto de referência num genoma que compreende uma sequência de ácido nucleico alvo ligada a um componente da amostra cujo duplo é detectável por alguns meios indicadores e o qual na sua dimensão mais estreita proporciona um sinal seguro e de confiança nas condições e protocolos da hibridização e de instrumentação, entre outras variantes, usados.

Uma banda pode ir desde uma dimensão estreita de uma sequência

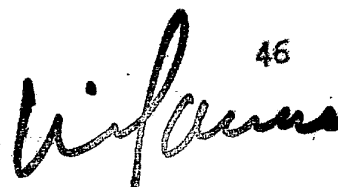


que proporciona um sinal seguro e de confiança, a um cromossoma total até múltiplas regiões num número de cromossomas.

As bandas produzidas pelas amostras da presente invenção deverão ser distinguidas das bandas produzidas por coloração química tal como se indicou acima no Enquadramento. As bandas produzidas pelas amostras da presente invenção são baseadas em sequências do ácido nucleico enquanto que as bandas produzidas por coloração química dependem das características naturais naturais dos cromossomas, mas não a sequência de ácido nucleico de facto. Além disso, os Modelos de bandas produzidas por coloração química são apenas interpretáveis em termos de cromossomas de metafase enquanto que as bandas produzidas pelas amostras da presente invenção são úteis para os cromossomas de metafase e interfase.

Um método para a formação das amostras da presente invenção consiste em juntar muitas amostras de baixa complexidade diferentes. A referida amostra compreenderá então uma "mistura heterogénea" de sequências clonadas individuais. O número de clones requerido depende da extensão de área alvo e da capacidade do vector de clonação. Se o sinal for formado por vários locais compactos e distintos, quer dizer, pontos únicos no limite da resolução microscópica, então cerca de 40 kb, de maior preferência 100 kb para cada ponto de um sinal seguro e de confiança dado pelas técnicas correntes. O troço de amostra para cada ponto pode ser feito, por exemplo, de uma única inserção de um cromossoma artificial de fermentação (YAC), de vários cosmídios contendo cada um 35-40 kb ou uma sequência de amostra ou de cerca de 25 plasmídios contendo cada 4 kb de sequência.

As misturas heterogéneas representativas de clones exemplificada na presente descrição incluem pages (Figuras 1, 2 e 3) e plasmídios (Figura 4). Os cromossomas artificiais de fermenta-



ção (YACS) (figuras 5) e o cromossoma humano único numa célula híbrida inter-espécies (Figura 6) são exemplos de amostras de elevado complexidade para os locais únicos e um cromossoma inteiro que pode ser propagado como um clone único.

Uma sequência de base em qualquer ponto no genoma pode ser classificada ou como "cópia única" ou como "repetitiva". Para fins práticos a sequência necessita de ser comprida o suficiente para que uma sequência de amostra complementar possa formar um híbrido estável com a sequência alvo nas condições de hibridização que estão a ser usadas. Esse comprimento é tipicamente na gama de várias dezenas até centenas de nucleótidos. Uma sequência de "cópia única" é aquela em que apenas uma cópia da sequência de ácido nucleico alvo se encontra presente no genoma haploide. As "sequências de cópia única" são também conhecidas na técnica como "sequências únicas". Uma "sequência repetitiva" é aquela em que existem mais do que uma cópia da mesma sequência de ácido nucleico alvo no genoma. Cada cópia de uma sequência repetitiva não necessita de ser idêntica a todas as outras. A característica importante é de que a sequência seja suficientemente semelhante aos outros membros da família de sequências repetitivas de forma a que, de acordo com as condições de hibridização a ser usadas, o mesmo fragmento de amostra de ácido nucleico seja capaz de formar híbridos estáveis com cada uma das cópias. Uma "sequência repetitiva partilhada" é uma sequência com algumas cópias no troço alvo do genoma, e alguns noutros lados. Quando os adjectivos "cópia única" "repetitiva", "repetitiva partilhada", entre outros modificadores dessa espécie, são usados para descrever sequências na amostra, eles referem-se ao tipo de sequência no sinal a que a sequência de amostra se irá ligar. Deste modo, uma "amostra repetitiva" é uma amostra que se liga a uma sequência repetitiva no sinal; e uma "amostra de cópia única" liga-se a uma sequência do sinal de cópia única.

As sequências repetitivas ocorrem em cópias múltiplas no genoma haploide. O número de cópias pode variar desde 2 até centenas de milhar, em que a família Alu do ADN representativo são exemplares da última variedade numerosa. As cópias de uma repetição podem ser agrupadas ou espalhadas pelo genoma. As repetições podem ser agrupadas num ou mais locais no genoma, por exemplo, as sequências repetitivas que ocorrem perto dos centrômeros de cada cromossoma e repetições tandem de número variável (VNTRs) [Nakamura et al., Science, 235, 1616 (1987)]7; ou as repetições podem ser distribuídas sobre um único cromossoma [por exemplo, repetições apenas descobertas no cromossoma X tal como é descrito por Bardoni et al., Cytogenet. Cell Genet., 46:575 (1987)]7; ou as repetições podem ser distribuídas por todos os cromossomas, por exemplo, a família Alu de sequências repetitivas.

Na presente invenção os termos sequências repetitivas, sequências repetidas e repetições são usadas interpermutavelmente.

As sequências repetitivas partilhadas podem ser agrupadas ou espalhadas. As sequências repetitivas agrupadas incluem as repetições de tandem que são assim denominadas porque são contíguas na molécula de ADN que forma a espinha dorsal de um cromossoma. As repetições agrupadas estão associadas a regiões bem definidas de um ou mais cromossomas, por exemplo, a região centromérica. Se uma ou mais repetições agrupadas formarem uma fracção medível de um cromossoma e se forem partilhadas com uma ou mais regiões não-alvo do genoma e consequentemente se forem removidas da mistura heterogênea dos fragmentos empregues na invenção, ou se a sua capacidade de hibridização for destruída, pode não ser possível uma perfeita uniformidade de manchar da região alvo. A referida situação é compreendida pelo uso do termo "substancialmente uniforme" por referência ao sinal.

A coloração de cromossomas específicos da presente invenção é realizado usando fragmentos de ácido nucleico que hibridizam para sequências específicas para o sinal. Estas sequências podem ser de cópia única ou repetitivas, em que as cópias de repetição ocorrem predominantemente na área alvo. A Figura 4H e os resultados do trabalho descrito na Secção V abaixo, indicam que as amostras podem ser feitas de sequências de cópia única. Contudo, em amostras tais como nas da Figura 4B, as repetições específicas de cromossomas de baixa cópia [Nakamura et al., e Bardoní et al., supra] podem contribuir também para a hibridização.

Se forem incluídos na amostra fragmentos de ácido nucleico complementares a troços não-alvo do genoma, por exemplo, sequências repetitivas partilhadas ou sequências não-específicas, a sua capacidade de hibridização necessita de ser suficientemente diminuída, ou a sua preponderância suficientemente reduzida para que possa ser obtido um contraste de manchamento adequado. A Secção V e a Figura 4H mostram exemplos de hibridização com amostras que contêm misturas de clones em que cada clone foi individualmente seleccionado para que hibridize para sequências de cópia única ou sequências repetitivas de cópia muito baixa. As figuras restantes ilustram o uso de amostras que contêm fragmentos que poderiam ter hibridizado para sequências repetitivas de cópia elevada, mas que tiveram a capacidade de hibridização dessas sequências diminuídas.

As amostras de ácido nucleico da presente invenção não necessitam de ser absolutamente específicas para o troço sinalizado de um genoma. Predente-se que elas produzam um "contraste de manchamento". O "contraste" é quantificado pela proporção de intensidade de mancha da região alvo do genoma com a de outras porções do genoma. Por exemplo, a livreria ADN produzida por clonagem de um cromossoma particular, tais como os referidos

na Tabela I, pode ser usada como uma amostra capaz de manchar todo o cromossoma. A livraria contém sequências encontradas apenas nesse cromossoma e sequências partilhadas com outros cromossomas. Num modelo simplificado (aproximadamente verdadeiro para viver) do genoma humano, cerca de metade do ADN cromossômico situa-se em cada classe. Se a hibridização com a livraria total fosse capaz de saturar todos os locais de ligação, o cromossoma alvo seria duas vezes mais claro (proporção de contraste de 2) do que os outros, uma vez que ele conterá sinal das sequências específicas e partilhadas da amostra, enquanto que o outro cromossoma só teria o sinal das sequências partilhadas. Deste modo, apenas uma fraca diminuição na hibridização das sequências partilhadas na amostra aumentará de forma substancial o contraste. As sequências de contaminação que apenas hibridizam para sequências não-sinalizadas, por exemplo, impurezas numa livraria, podem ser toleradas na amostra desde que as referidas sequências não reduzam o contraste de manchamento abaixo dos níveis úteis.

Na realidade, todos os locais alvo podem não ser saturados durante a hibridização e muitos outros mecanismos contribuem para produzir-se contraste de manchamento, mas este modelo ilustra uma consideração em geral no uso de amostras sinalizadas num grande troço do genoma.

O contraste requerido depende da aplicação a que a amostra se destina. Quando se visualizam os cromossomas, núcleos, etc., microscopicamente, uma média de contraste de dois ou mais e muitas vezes suficiente para identificar um cromossoma total. Nas Figuras 4D-F, a média de contraste é de 3-5. Quanto mais pequenos forem os segmentos individuais da região alvo, maior necessita de ser o contraste para permitir o reconhecimento seguro e de confiança do sinal relativo às flutuações no manchamento dos troços não sinalizados. Quando se quantifica a

Wiferna

quantidade de região alvo presente num núcleo de célula por medições de intensidade fluorescente usando citometria de passagem ou microscopia quantitativa, a média de contraste requerida é na ordem de $1/T$ ou maior em média para o genoma, em que T é a fração do genoma contido na região sinalizada. Quando a média de contraste é igual a $1/T$, metade da intensidade de fluorescência total vem da região alvo e a outra metade do resto do genoma. Por exemplo, quando se usa uma amostra de elevada complexidade para o cromossoma 1, que compreende cerca de 10 % do genoma, a média de contraste requerido situa-se na ordem de 10, quer dizer, para o cromossoma 1 a intensidade de fluorescência é igual à do resto do genoma. A coloração de base feita pela amostra, quer dizer, para a região não-sinalizada do genoma, pode não ser uniforme. A Figura 4F mostra que a amostra específica do cromossoma 21 contém fragmentos de amostra que hibridizam de forma fraca para regiões compactas próximo de centrómeros de outros cromossomas humanos acrocêntricos. Este grau de não-especificidade não inibe o seu uso nas aplicações ilustradas. Para outras aplicações, pode ser necessária a remoção ou a posterior destruição de capacidade de hibridização dos fragmentos da amostra que se ligam a estas sequências.

Para outras explicações, as sequências repetitivas que se ligam a centrómeros, por exemplo, sequências alfa-satélite, e/ou telómeros, podem ser parte dos reagentes de coloração específicos de cromossomas em que o sinal inclui alguns ou todos os centrómeros e/ou telómeros de um genoma juntamente com talvez outras regiões cromossômicas. Um exemplo de uma tal aplicação seria aquela em que o reagente de coloração é designado para detectar aberrações estruturais ao acaso causadas por agentes clastogénicos que resultam em cromossomas dicêntricos e outras anormalidades estruturais, tais como as translocações. A adição de sequências que se ligam a todos os centrómeros num genoma, por exemplo, à amostra usada para criar o modelo de mancha-

mento de Figura 4D, permitiriam distinguir de forma mais segura e digna de confiança entre dicêntricos e translocações.

A aplicação de reagentes de coloração da presente invenção para um genoma, resulta numa distribuição substancialmente uniforme de amostra hibridizada para as regiões sinalizadas do genoma. Considere-se a distribuição de amostra ligada como "substancialmente uniforme" se as regiões sinalizadas do genoma puderem ser visualizadas com contraste útil. Por exemplo, um sinal é substancial e uniformemente manchado no caso em que é uma série de locais visualmente separados e se a maior parte dos locais forem visíveis na maior parte das células.

"Proporções substanciais" em referência às sequências de base de fragmentos do ácido nucleico que são complementares para o ADN cromossômico significa que a complementaridade é suficientemente extensiva para que os fragmentos formem híbridos estáveis com o ADN cromossômico nas condições de hibridização usadas. Em particular, o termo compreende a situação em que os fragmentos de ácido nucleico da mistura heterogênea possui algumas regiões de sequência que não são perfeitamente complementares para o material cromossômico alvo. O aperto pode ser ajustado para controlar a precisão de complementaridade requerida para a hibridização.

A frase "cromossomas de metafase" é aqui definida para significar não apenas os cromossomas condensados na fase de metafase de mitose mas inclui quaisquer cromossomas condensados, por exemplo, os condensados por condensação prematura do cromossoma.

Para destruir a capacidade de hibridização de uma sequência de ácido nucleico, por vezes abrevia-se aqui para "destruição da sequência de ácido nucleico".

Os métodos e reagentes da presente invenção encontram uma aplicação particularmente apropriada no campo dos citogenéticos de diagnóstico, em particular no campo dos citogenéticos de diagnóstico de interfase. Os rearranjos genéticos de detecção que estão associados com a doença tal como o cancro, são uma aplicação específica dos reagentes específicos de cromossomas e dos métodos de coloração da presente invenção.

Os síndromas genéticos contíguos são um exemplo dos rearranjos genéticos que as amostras e métodos da presente invenção podem identificar. Os síndromas genéticos contíguos são caracterizados pela presença de vários genes pouco espaçados que se encontram em número múltiplo ou reduzido de cópias. O síndrome de Down é um exemplo de um síndrome genético contíguo em que se encontra presente uma cópia extra de uma região cromossómica contendo vários genes.

Descreve-se aqui, em particular, a aplicação de reagentes de cromossomas específicos e métodos para detectar rearranjos genéticos que produzem a fusão de BCR-ABL associado com o CML. Esses reagentes são exemplares de amostras de doenças específicas, neste caso, de tumores específicos, que podem ser marcados, directa ou indirectamente, de modo a que sejam visualizadas quando ligadas ao material cromossómico sinalizado, que no caso da CML, é a proximidade das regiões de interrupção da translocação, das regiões cromossómicas 9q34 e 22q11, conhecidas como estando associadas com a CML. Nos Exemplos dados na Secção VIII do presente pedido de patente, as amostras são marcadas de modo a que se produza uma fluorescência dual de cores no modelo de manchamento das referidas amostras com a hibridização in situ (hibridização fluorescente in situ (FISH); contudo, os modelos de manchamento podem ser produzidos em muitas cores bem como outros tipos de sinais, podendo ser usados nos métodos da presente invenção quaisquer meios de visualiza-

ção para assinalar a amostra ligada ao seu sinal.

A Secção VIII da presente descrição descreve métodos e reagentes representativos da presente invenção para detectar rearranjos genéticos. Os exemplos da Secção VIII referem-se a rearranjos genéticos que produzem a fusão de BCR-ABL que é característica da CML. A abordagem nos referidos exemplos é baseado na FISH com amostras dos cromossomas 9 e 22 que flanqueiam as sequências de BCR e ABL fundidas essencialmente em todos os casos de CML (Figura 8). As amostras quando hibridizadas para o material cromossómico das células normais e anormais produzem modelos de manchamento que são diferentes, tal como se ilustra nas Figuras 8-12. Os modelos de manchamento produzidos por essas amostras exemplares são diferentes nas células normais e anormais; o modelo de manchamento presente quando ocorre o rearranjo genético é distintamente alterado do do modelo de manchamento mostrado quando se hribridizam as amostras para material cromossómico que não contém o rearranjo genético. Além disso, os modelos de manchamento são distintamente diferentes de um tipo de rearranjo genético para o outro. Por exemplo, os modelos de manchamento produzidos pela hibridização das amostras de ácido nucleico da presente invenção para material cromossómico contendo um rearranjo genético associado com ALL é distintamente diferente do de produzido pela hibridização dessas amostras para material cromossómico contendo a fusão BCR-ABL característica da CML. Deste modo, os métodos e reagentes da presente invenção são úteis para diagnóstico diferenciados de doenças relacionadas.

Os exemplos da Secção VIII referem-se ao diagnóstico de CML com base na proximidade dos sinais fluorescentes nos modelos de manchamento e contam com um ponto de corte de 1 micra para a determinação da presença de uma fusão. A distância da proximidade dos sinais é apenas uma característica entre muitas outras, dos sinais que podem ser usados para detectar a presença

Wifama

de um rearranjo genético. Além disso a distância da proximidade depende das técnicas de preparação das células particulares empregue e do tamanho dos núcleos nas manchas e é relativa para uma preparação de células particular, dependendo da distância entre os sinais nas células normais e anormais.

Os modelos de manchamento exemplificados nos exemplos de Secção VIII são representativos de um tipo de estratégia de amostra. Podem ser empregues muitas outras estratégias de amostras. A Figura 11 ilustra algumas estratégias de amostras exemplares para detectar rearranjos genéticos, cujos modelos podem ser modificados e optimizados e alterados de outras formas, para detectar rearranjos genéticos particulares.

O uso de outros reagentes de doenças específicas da presente invenção será análogo aos métodos descritos na Secção VIII para a CML. Por exemplo, o diagnóstico e o estudo da leucemia linfocítica aguda (ALL) pode ser realizado substituindo a amostra de BCR (PEM12) da Secção VIII por uma amostra da extremidade 5' do gene BCR. A ALL é de particular interesse porque o cromossoma Ph⁺ é a anormalidade citogenética mais comum nessa doença, e a presença desse cromossoma é indicativo de um neoplasma muito agressivo.

Os métodos e reagentes aqui exemplificados, em particular na Secção VIII, fornecem os meios para distinguir entre doenças citogeneticamente semelhantes mas geneticamente diferentes. "Citogeneticamente" nesse contexto particular refere-se a uma semelhança determinada por análise de bandas convencional. A CML e ALL são, nesse contexto citogeneticamente semelhantes no sentido de que a análise de bandas convencional não as pode distinguir devido ao facto de os pontos de interrupção estarem tão próximos uns dos outros no genoma humano.

Além disso, a presente invenção proporciona métodos e reagen-

tes que podem ser usados num modo de pesquisa citogenética para o estudo das bases moleculares de doenças genéticas. Por exemplo, se for notada uma anormalidade no cariótipo de uma pessoa pela análise de bandas convencional, as amostras e reagentes da presente invenção podem ser usados para detectar quaisquer rearranjos genéticos nas proximidades da referida anormalidade. A base molecular subjacente da anormalidade pode ser determinada pelos métodos e reagentes da presente invenção e as diferenças resultantes ao nível genético podem ser indicativas de planos de tratamento diferentes e prognosticamente importantes. Os rearranjos genéticos subjacentes podem ser considerados como estando consistentemente associados com um conjunto de características fenotípicas numa população.

As Secções seguintes dão exemplos de fazer e usar as composições de manchamento da presente invenção, destinando-se apenas a servirem como ilustração e não pretendem de forma alguma limitar de qualquer forma a presente invenção. São usadas as abreviaturas seguintes.

Abreviaturas

- BE - tampão de bicarbonato com NP-40
- DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindol
- DCS - tal como na DCS de fluoresceína-avidina (um grau de classificação de células de fluoresceína Avidin D) à venda no comércio)
- AAF - N-acetoxi-N-2-acetil-aminofluoreno
- EDTA - tetraacetato de etileno diamina
- FACS - saída de fluorescência activada de células.

Wifama

- PITC - isotiocianato de fluoresceína
IB - tampão de isolamento
NP-40 - detergente não-iônico à venda no comércio da Sigma como Nonidet P-40 (St. Louis, MO)
PBS - salina tamponada de fosfato
PI - iodeto de propídio
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonilo
Tampão PN - mistura de NaH_2PO_4 0,1M e Na_2HPO_4 0,1M, PBS; NP-40 a 0,1 %
Tampão PNM - tampão PN mais 5 % de leite seco magro (centrifugado); azida de Na 0,02 %.
SDS - dodecil-sulfato de sódio
SSC - NaCl 0,15M / citrato de Na 0,015M, pH7
VNTR - repetição tandem de número variável.

I. Métodos de Preparação de Reagentes de Coloração Específicos de Cromossomas

I.A. Isolamento do ADN Específico de Cromossomas e Formação de Bibliotecas de Fragmentos de ADN

A primeira etapa num método preferido de preparar as composições da presente invenção, consiste em isolar o ADN específico de cromossomas (cujo termo inclui ADN específico de sinal e/ou ADN específico de região, tal como se indica acima, em que específico se refere à origem do ADN). Esta etapa inclui, em primeiro lugar, o isolamento de uma quantidade suficiente do tipo de cromossoma particular ou da sub-região cromossômica a que

é dirigida a composição de coloração, em seguida extraíndo a ADN do cromossoma ou dos cromossomas isolados ou da sub-região ou sub-regiões cromossômicas. Aqui "quantidade suficiente" significa suficiente para levar a cabo as etapas subsequentes do método. De preferência, o ADN extraído é usado para criar uma livraria de inserção de ADN por clonagem usando técnicas de engenharia genética conhecidas.

Os vectores de clonagem preferidos incluem, mas não se limitam a cromossomas artificiais de fermentação (YACS), plasmídios, bacteriófagos e cosmídios. Os plasmídios preferidos são os plasmídios de Bluescribe; os bacteriófagos preferidos são os vectores de inserção de lambda, mais preferencialmente o Charon 4A, Charon 21A, Charon 35, Charon 40 e o GEM11; e os cosmídios preferidos incluem o Lawrist 4, Lawrist 5 e sCos1.

Tal como se indicou acima, o ADN pode ser isolado de qualquer fonte. Os reagentes de coloração específicos de cromossomas podem ser feitos de ADN de plantas e animais, de acordo com os métodos da presente invenção. As fontes importantes de ADN animal são os mamíferos, em particular, os primatas ou roedores, em que as fontes de primatas são, mais particularmente, o homem e o macaco e as fontes de roedores são mais particularmente as ratazanas ou ratinhos e mais particularmente os ratinhos.

1. Isolamento do ADN de um Cromossoma total

Um meio preferido para isolar cromossomas particulares na sua totalidade (tipos de cromossomas específicos) é pela distribuição de passagem directa [distribuição de fluorescência activada de células (FACS)] de cromossomas de metafase com ou sem o uso de sistemas interespecíficos de células híbridas. Para

algumas espécies qualquer cromossoma pode ser isolado por técnicas de distribuição correntemente conhecidas. A maior parte, mas não todos, os cromossomas humanos são correntemente isoláveis pela distribuição de passagem de células humanas, Carrano et al., "Measurement and Purification of Human Chromosomes by Flow Cytometry and Sorting", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 76, pag. 1382-1384 (1979). Deste modo para o isolamento de alguns cromossomas humanos, pode ser necessário o uso do sistema de células híbridas de humanos/roedores, veja-se Kao, "Somatic Cell Genetics and Gene Mapping", International Review of Cytology", Vol. 85, pag. 109-146 (1983), para uma revista e Gusella et al., "Isolation and Localization of DNA Segments from Specific Human Chromosomes", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 77, pag. 2829-2833 (1980). A saída de Cromossomas, pode ser feita por máquinas de distribuição de fluorescência activadas, à venda no comércio, por exemplo, Becton Dickinson FACs-II, distribuidor Coulter Epics V, ou distribuidores para fins especiais optimizados para a distribuição de cromossomas ou instrumentos semelhantes.

O ADN é extraído dos cromossomas isolados por meio de técnicas conhecidas, por exemplo, Marmur, "A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-Organisms", J. Mol. Biol., Vol. 3, pag. 208-218 (1961); ou Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982), pag. 280-281. Estas referências são aqui incorporadas por referência para as suas descrições de técnicas de isolamento de ADN.

A geração de livrarias de inserções a partir do ADN específico de cromossomas isolado é levado a cabo usando técnicas de engenharia genética conhecidas, por exemplo, Davies et al., "Cloning of a Representative Genomic Library of the Human X Chromosome After Sorting by Flow Cytometry", Nature, Vol. 293, pag.

374-376 (1981); Keumhamf et al., "Construction and Characterization of Genomic Libraries from Specific Human Chromosomes", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 79, pag. 2971-2975 (1982); Lawn et al., "The Isolation and Characterization of Linked Delta- and-Beta. Globin Genes from a Cloned Library of Human DNA", Cell, Vol. 15, pag. 1157-1174 (1978); e Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Springs, Harbor Laboratory, 1982), pag. 256-308; Van Dilla et al., Id; Fuscoe, Gene, 52:291 (1987); e Fuscoe et al., Cytogenet. Cell Genet., 43:79 (1986). As referidas referências são aqui incorporadas por referência.

As bibliotecas de ADN recombinantes para cada um dos cromossomos humanos foram construídas pela National Laboratory Gene Library Project e encontram-se à disposição na American Type Culture Collection. [Van Dilla et al., Biotechnology, 4:537 (1986)]. Foram construídas livrarias contendo pequenas inserções por meio da digestão completa de ADN genômico de cromossomas humanos de passagem seleccionada com Hind III ou EcoRI e clonagem no vector de inserção Lambda Charon 21A. O vector é capaz de aceitar inserções humanas até 9.1'kb de tamanho. Desse modo, os fragmentos de restrição Hind III (ou EcoRI) superiores a 9.1'kb não serão recuperados destas bibliotecas. O tamanho médio de inserção observado nestas livrarias é aproximadamente 4 kb. Uma lista representativa das livrarias específicas de cromossomas Hind III com os seus números de acesso estão referidas na Tabela 1.

*Wifana*T A B E L A 1Bibliotecas Genômicas Específicas de Cromossomas Humanos no
Vector Charon 21A

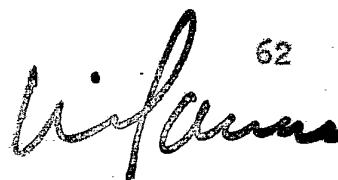
<u>CHROMOSSOMA</u>	<u>ATCC #</u>	<u>BIBLIOTECA</u>
1	57753	LL01NS01
1	57754	LL01NS02
2	57744	LL02NS01
3	57751	LL03NS01
4	57700	LL04NS01
4	57745	LL04NS02
5	57746	LL05NS01
6	57701	LL06NS01
7	57755	LL07NS01
8	57702	LL08NS02
9	57703	LL09NS01
10	57736	LL10NS01
11	57704	LL11NS01
12	57756	LL12NS01
13	57705	LL13NS01
13	57757	LL13NS02
14	57706	LL14NS01
14/15	57707	LL99NS01
15	57737	LL15NS01
16	57758	LL16NS03

T A B E L A 1 - (continuação)

<u>CROMOSSOMA</u>	<u>ATCC #</u>	<u>BIBLIOTECA</u>
17	57759	LL17NS02
18	57710	LL18NS01
19	57711	LL19NS01
20	57712	LL20NS01
21	57713	LL21NS02
22	57714	LL22NS01
X	57747	LLOXNS01
Y	57715	LLOYNS01

Alternativamente, o ADN extraído de um tipo de cromossoma de passagem seleccionada, pode ser amplificado pela reacção de cadeia de polimerase (PCR) que não pela clonação do ADN extraído num vector ou propagando-o numa linha de células. São adicionados acompanhamentos apropriados ao ADN extraído em preparação para o PCR. São dadas referências para os referidos processos de PCR na Secção I.B abaixo.

Outros métodos possíveis de isolamento das sequências desejadas das células híbridas incluem os de Schmeckpeper et al., "Partial Purification and Characterization of DNA from Human X chromosome", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 76, pag. 6525-6528 (1979); ou Olsen et al., supra (no Enquadramento). Deste modo, estas referências são aqui incorporadas por referência.



2. Isolamento de ADN de um Troço de um Cromossoma

De entre os métodos que podem ser usados para isolar ADN cromossómico específico de região, inclui a selecção de uma região cromossómica apropriada do ADN que foi previamente assinalado, por exemplo de uma livraria e cosmídios assinalados; a distribuição de cromossomas derivados, por exemplo, por FACS; a micro-dissecção de material cromossómico seleccionado; hibridização substractiva; a identificação de uma célula híbrida apropriada contendo um fragmento cromossómico desejado, extraíndo e amplificando o ADN e seleccionando o ADN amplificado desejado; e a selecção de material cromossómico apropriado de híbridos de radiação. As técnicas de engenharia genética conhecidas acima referidas na sub-secção I.A.1 são usadas nesses processos bem conhecidos para os peritos na matéria. A amplificação do ADN específico de região pode ser levado a cabo por meio de clonação num vector apropriado propagação numa linha de células apropriada e/ou pelo uso de PCR (veja-se I.B. abaixo).

Um método preferido de isolamento de ADN cromossómico de região específico e o uso de pequenas sequências de ADN marcadas para registar uma livraria de sequências de ADN maiores, em que a última livraria foi clonada de forma usual, num vector diferente. Por exemplo, uma amostra clonada num plasmídeo pode ser usada para provar um cosmídeo ou uma livraria de um cromossoma artificial de fermentação (YAC). Usando uma amostra como semente inicial, poderão descobrir-se clones sobrepostos na livraria de inserção maior (um processo denominado "Walking") podendo ser produzida uma amostra com uma maior complexidade para a coloração segura e de confiança da região cromossómica que circunda a amostra de semente. Por último, logo que tenha sido assinalado um genoma inteiro para uma espécie (por exemplo, pelo Human Genome Project para as espécies humanas), pode-

rão ser obtidos os clones requeridos para todo o genoma de espécie. Pode-se então facilmente seleccionar os clones apropriados para formar uma amostra com a especificidade desejada.

Um outro método para isolar o ADN de uma região ou regiões cromossômicas (ou também um cromossoma completo) consiste em propagar essa região ou regiões cromossômicas numa linha de células apropriada (por exemplo uma linha de células híbridas, tais como uma célula híbrida humana/criceto), extrai-se o ADN da linha de células e clona-se num vector apropriado e seleccionam-se clones contendo ADN humano para formar uma livraria. Quando é usada uma célula híbrida, os cromossomas na célula híbrida que contém o material cromossômico humano podem-se ser separados por distribuição de passagem (FACS) antes da clonagem a fim de aumentar a frequência de clones humanos na livraria. Ainda além disso, o ADN total da célula híbrida pode ser isolado e marcado sem outra clonagem e usado como amostra tal como exemplificado na Figura 6.

3. Amostras de cadeia única. Nalguns casos é preferível que os fragmentos de ácido nucleico da mistura heterogénea consista em RNA ou ADN de cadeia única. Nalgumas condições, descobriu-se que a espécie da ligação das amostras de ácido nucleico de cadeia única era superior durante a hibridização in situ, por exemplo, Cox et al., "Detection of mRNAs in Sea Urchin Embryos by in Situ Hybridization Using Asymmetric RNA Probes", Developmental Biology, Vol. 101, pag. 485-502 (1984).

São usados métodos conhecidos para gerar fragmentos de RNA a partir de fragmentos isolados de ADN. Por exemplo, um método desenvolvido por Green et al., descrito in Cell, Vol. 32, pag. 681-694 (1983) encontra-se à disposição no comércio na Promega Biotec (Madison, WI) sob a marca registada "Riboprobe". Outros

Wifama 64

— estojos de transcrição apropriados para serem usados com a presente invenção encontram-se à disposição na United States Biochemical Corporation (Cleveland, OH) sob a marca registrada "Genescribe". Podem ser produzidas amostras de ADN de cadeia única com o bacteriófago M13 de cadeia única, também disponível sob a forma de estojo, por exemplo, Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD). As hibridizações ilustradas na Figura 4 foram realizadas com as livrarias da Tabela 1 subclonadas no vector do plasmídeo Bluescribe (Stratagene, La Jolla, CA). O plasmídeo Bluescribe contém promotores de RNA que permitem a produção de amostras de cadeia única.

A Seção IX abaixo, proporciona métodos para a preparação e aplicação de amostras de ácido nucleico de cadeia única não-auto-complementares que aumentam as médias sinal-para-barulho atingíveis com a hibridização in situ reduzindo a ligação não-específica e diferente de amostra. Essa seção proporciona ainda métodos para desnaturar ácido nucleico e sinal de cadeia única que minimiza as regiões de cadeia única disponíveis para a hibridização que são não-complementares para as sequências de amostra. Reunindo, a amostra é construída tratando-se ADN com uma enzima de restrição e uma exonuclease para formar modelos primários para uma polimerase de ADN. A cadeia digerida é resistetizada na presença de um precursor de trifosfato de nucleosídeo marcado e os fragmentos de cadeia única marcados são separados dos fragmentos resistetizados para formar a amostra. O ácido nucleico de sinal é tratado com a mesma enzima de restrição usada para construir a amostra, e é tratado com uma exonuclease antes de aplicação de amostra.

I.B. PCR

— Um outro método de produção de amostras da presente invenção

inclui o uso de reacção de cadeia de polimerase (PCR). [Para uma explicação dos mecanismos do PCR, veja-se Saiki et al., Science, 230:1350 (1985) e as Patentes Norte-Americanas Nºs. 4 683 195, 4 683 202 (ambas publicadas em 28 de Julho de 1987) e 4 800 159 (publicada em 24 de Janeiro de 1989)]7. As sequências de ácido nucleico específicas de sinal, isoladas tal como se indicou acima, podem ser amplificadas por PCR para produzir sequências específicas de sinais que são reduzidas em ou livres de sequências repetitivas. Os modelos primários PCR usados para esse processo são para as extremidades das sequências repetitivas, resultando na amplificação de sequências flanqueadas pelas repetições.

A Figura 7 ilustra esse método de uso do PCR em que a sequência repetitiva representativa é o Alu. Se se amplificarem pequenos segmentos apenas, é possível que essas sequências estejam livres de outras repetições, proporcionando assim ADN reduzido em sequências repetitivas.

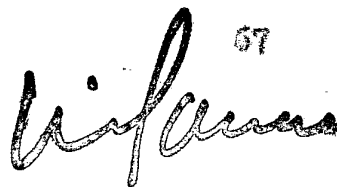
Pode ainda suprimir-se a produção de sequências repetitivas no referido processo de PCR hibridizando primeiro sequências complementares para a referida sequência repetitiva em que as referidas sequências complementares têm extremidades de bloqueamento não-complementares compridas ou terminam em nucleótidos que não permitem a extensão pela polimerase. As extremidades não-complementares das sequências de bloqueamento impedem que as sequências de bloqueamento actuem como modelo primário de PCR durante o processo PCR.

II. Remoção das Sequências Repetitivas e/ou Impedimento da Capacidade de Híbridização das Sequências Repetitivas

Tipicamente, uma amostra da presente invenção é produzida por meio de várias etapas incluindo: obtenção de sequências de ácido nucleico fonte que sejam complementares para a região sinal do genoma, marcação e outro processamento das mesmas de forma a que venham a hibridizar de forma eficiente para o sinal e possam ser detectadas depois de se ligarem e tratando-as quer para impedir a capacidade de hibridização ou para remover uma proporção suficiente de sequências repetitivas partilhadas ou para ambas as coisas, destruir e remover as referidas sequências. A ordem destas etapas depende dos processos específicos empregues.

Os métodos seguintes podem ser usados para remover sequências repetitivas partilhadas e/ou impedir a capacidade de hibridização dessas sequências repetitivas partilhadas. Esses métodos são representativos e são expressos esquematicamente em termos de procedimentos bem conhecidos para os peritos na matéria e que podem ser modificados e aumentados de acordo com os parâmetros e processos conhecidos na técnica.

1. Amostras de cópia única. Uma amostra de cópia única consiste em fragmentos de ácido nucleico que são complementares para sequências de cópia única contidas na região sinal do genoma. Um método de construção da referida amostra consiste em começar com uma livraria de ADN produzida por clonagem da região sinal. Alguns dos clones na livraria conterão ADN cuja sequência completa é uma cópia única; outros conterão sequências repetitivas; e ainda outros terão trechos de sequências de cópia única e de sequências repetitivas. A selecção, numa base de clone a clone e a junção desses clones contendo apenas



sequências de cópia única resultará numa amostra que hibridizará especificamente para a região sinal. A natureza de cópia única de um colono pode ser por último estabelecida pela hibridização de Southern, usando técnicas conhecidas. A Figura 4H mostra a hibridização com 120 clones seleccionados desta maneira de uma livreria de cromossoma 4.

A análise de Southern é muito morosa, e trabalhosa. Por isso, são úteis métodos de selecção menos perfeitos mas mais eficientes para a obtenção de clones de cópia única candidatos. Na Secção V.B, dão-se exemplos de métodos melhorados para a selecção dos clones de fage e plasmídios individuais para a presença de ADN repetitivo usando a hibridização com ADN genómico. A selecção de clones de plasmídios é mais eficaz e aproximadamente 90 % dos colones seleccionados contém apenas sequências de cópia única; o restante contém repetições de cópia baixa. Contudo, as amostras produzidas desta maneira podem produzir um contraste de coloração adequado, indicando que as sequências de cópias baixa podem ser toleradas na amostra. (Veja-se sub-secção 3 desta secção).

Uma desvantagem dos procedimentos de clone após clone é de que o clone é descartado mesmo se apenas uma porção de sequência que contém for repetitiva. Quanto maior for o comprimento do ácido nucleico clonado, maior será a chance de que contenha uma sequência repetitiva. Por isso, quando o ácido nucleico é propagado num vector que contém inserções grandes tais como um cosmídeo, YAC ou numa linha de células, tais como células híbridas, pode ser vantajoso sub-cloná-lo em troços mais pequenos antes de se efectuar a selecção de cópia única. Os processos de selecção acabados de refirir acima não discriminam entre sequências partilhadas e sequências repetitivas específicas; não são usadas na amostra clones com sequências repetitivas detectáveis de qualquer dos tipos.

68
Wifama

2. Insaio individual das propriedades de hibridização

A especificidade de hibridização de um troço de ácido nucleico, por exemplo, um clone, pode ser testado por meio de hibridização *in situ*. Se, de acordo com as condições de hibridização apropriadas se ligar a sequência de cópia única ou a sequências repetitivas específicas da região sinalizada desejada, pode ser incluída na amostra. São já conhecidas muitas sequências com características de hibridização específicas, tais como as sequências repetitivas de cromossomas específicos [Trask et al., *supra*, (1988)] e as referências feitas no mesmo⁷, VETAS, numerosas sequências assinaladas de cópia única. Estão a ser continuamente assinaladas mais. As referidas sequências podem ser incluídas numa amostra da presente invenção.

3. Processos em massa. Em muitos genomas, tais como o genoma humano, uma porção maior de ADN repetitivo partilhado está contido em poucas famílias de sequências altamente repetitivas, tais como a Alu. Uma amostra que esteja substancialmente livre dessas sequências repetitivas de cópia elevada, produzirá um contraste de manchamento útil em muitas aplicações. Essa amostra pode ser produzida a partir de algumas fontes das sequências de ácido nucleico, por exemplo, as bibliotecas da Tabela I, com processos em massa relativamente simples. Por conseguinte, esses processos em massa são os métodos preferidos para tais aplicações.

Estes métodos exploram principalmente o facto de que a taxa de hibridização das cadeias de ácido nucleico complementares aumenta à medida que a sua concentração aumenta. Deste modo, se uma mistura heterogénica de fragmento de ácido nucleico for desnaturada e incubada em condições que permitam a hibridização, as sequências presentes numa concentração elevada tornar-

-se-ão de cadeia dupla mais rapidamente do que as outras. O ácido nucleico de cadeia dupla pode ser então renovado e o restante usado como amostra. Alternativamente, a mistura parcialmente hibridizada pode ser usada como amostra, não podendo as sequências de cadeia dupla ligar-se, ao sinal. Não-se, em seguida, métodos representativos de processos em massa, que são úteis para a produção de manchamento específico de sinal da presente invenção.

3a. Auto-reassociação da amostra

O ácido nucleico da amostra de cadeia dupla na mistura de hibridização é desnaturado e depois incubado em condições de hibridização durante um período de suficiente para que as sequências de cópia elevada na amostra se tornem substancialmente de cadeia dupla. A mistura de hibridização é depois aplicada à amostra. As restantes cópias de cadeia única marcadas das sequências altamente repetidas ligam-se por toda a amostra produzindo um sinal fraco, e largamente distribuído. A ligação de multiplicidade de sequências de cópia baixa específicas para a região pretendida do genoma, produzem um sinal específico facilmente distinguível.

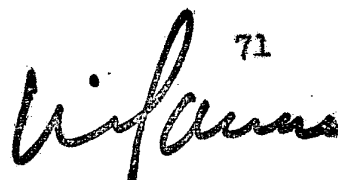
O referido método é exemplificado na Secção VI-B (abaixo) com bibliotecas de cromossomas específicos para os cromossomas 4 e 21 (pRS4 e pRS21)) como amostras para esses cromossomas. Pinkol et al., PNAS (USA), 85:9138-9142 (Dezembro, 1988)7. A mistura de hibridização que contém uma concentração de amostra na gama de 1-10 ng/ml foi aquecida para desnaturar a amostra e incubou-se a 37°C, durante 24 horas antes da aplicação à amostra.

Wifama

3b. Uso do ácido nucleico de bloqueamento

Adicionam-se sequências de ácido nucleico não marcadas, que são complementares às sequências na amostra cuja capacidade de hibridização se deseja inibir, à mistura de hibridização. Desnaturam-se a amostra e o ácido nucleico de bloqueamento, se necessário, e incubam-se sob condições de hibridização apropriadas. As sequências a serem bloqueadas, tornam-se de cadeia dupla mais rapidamente do que as outras e, por conseguinte, são incapazes de se ligar ao sinal quando a mistura de hibridização é aplicada ao sinal. Em alguns casos, a reação de bloqueamento ocorre tão depressa que o período de incubação pode ser muito pequeno, podendo obter-se resultados adequados se a mistura de hibridização for aplicada ao sinal imediatamente depois da desnaturação. É geralmente descrito um método de bloqueamento por Sealy et al., "Removal of Repeat Sequences from Hybridization Probes", Nucleic Acid Research, **13:1905 (1985)**, cuja referência se incorpora aqui por referência. Exemplos de ácidos nucleico de bloqueamento incluem o ADN genómico, uma fracção de cópia elevada de ADN genómico, e sequências particulares tal como se referem abaixo (i-iii).

3b.i. ADN Genómico. O ADN genómico contém todas as sequências de ácido nucleico do organismo em proporção com o seu número de cópias no genoma. Deste modo, a adição de ADN genómico à mistura de hibridização aumenta a concentração das sequências de repetição de cópia elevada mais do que as sequências de cópia baixa e, por isso, é mais eficaz no bloqueamento do primeiro. Contudo, o ADN genómico contém cópias das sequências que são específicas para o sinal e deste modo, também reduzirão a ligação de cromossoma específico desejado se se adicionar em demasia. As linhas gerais para determinar quanto se deve adicionar de ADN genómico (veja-se 3.c. Conceito de C,



abaxo) e os exemplos de uso do ADN de bloqueamento genómico, são dados abaixo. A eficácia de bloqueamento do ADN genómico pode ser aumentada de acordo com algumas condições, ajustando o tempo de adição do mesmo à mistura de hibridização; são dados exemplos desses ajustamentos de tempo com as hibridizações do Protocolo I e do Protocolo II ilustrado nas Figuras 4B a E (Protocolo I) e Figura 4F (Protocolo II) e pormenorizadas na Secção VII, abaixo.

3b.ii. Fracção de ADN genómico de cópia elevada. A dificuldade com o uso do ADN genómico é de que também bloqueia a hibridização das sequências de cópia baixa, que são predominantemente as sequências que dão o manchamento de sinal desejado. Deste modo, o fraccionamento do ADN genómico para se obterem apenas as sequências de cópia elevada e usando-as para o bloqueamento, vence esta dificuldade. Tal fraccionamento pode ser feito, por exemplo, com hidroxapatite, tal como se descreve abaixo em (3c.i.).

3b.iii. Sequências especificadas. O bloqueamento de uma sequência particular na amostra pode ser efectuado adicionando-se muitas cópias não marcadas dessa sequência. Por exemplo, as sequências Alu na amostra podem ser bloqueadas adicionando ADN de Alu clonado. O ADN de bloqueamento feito a partir de uma mistura de algumas clones contendo as sequências de cópia mais elevada no genoma humano pode ser usado de forma eficaz com bibliotecas de cromossomas específicos, por exemplo, as da Tabela I. Alternativamente, as sequências de ácido nucleico não marcadas, de uma ou mais bibliotecas de cromossomas específicas poderiam ser usadas para bloquear uma amostra contendo sequências marcadas de uma ou mais das outras livrarias de cromossomas específicas. As sequências partilhadas seriam



— bloqueadas, enquanto que as sequências que ocorrem apenas no cromossoma de sinal ficariam ser ser afectadas. A Figura 4F mostra que o ADN genómico não foi eficaz no bloqueamento completo da hibridização de uma sequência ou sequências partilhadas pelo cromossoma humano 21 e as regiões contraméricas dos outros cromossomas humanos acrocêntricos. Quando um clone ou clones que contêm uma tal sequência ou sequência é ou são eventualmente isolados, o ADN não marcado produzido a partir dos mesmos poderá ser adicionado ao ADN genómico de bloqueamento para aumentar a especificidade do manejamento.

3C. Remoção das Sequências

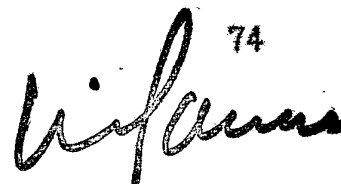
3C.1. Hidroxiapatite

Os ácidos nucleicos de cadeia dupla e única têm diferentes características de ligação à hidroxiapatite. Essas características proporcionam uma base normalmente usada para o fracionamento de ácidos nucleicos. A hidroxiapatite encontra-se à disposição no comércio (pg. Bio-Rad Laboratoies, Richmond, CA). A fracção do ADN genómico que contém as sequências com um grau de repetição particular, desde o número de cópia mais elevado até à cópia única, pode ser obtida desnaturando ADN genómico, deixando-o reassociar-se em condições apropriadas para um valor de C_0t particular, seguido de separação usando hidroxiapatite. O ácido nucleico de cadeia única e dupla pode também ser descriminado usando nuclease S1. Essas técnicas e o conceito de Cot são explicados em Britten et al., "Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation", in Methodes in Enzimology, Vol. 29, pag. 363-418 (1974), artigo esse que é aqui incorporado por referência.

— A fracção de ácido nucleico de cadeia única produzida em 3a.

ou 3b. acima, pode ser separada por meio de hidroxiapatite e usado como amostra. Deste modo, as sequências que forem bloqueadas (que se tornem de cadeia dupla) são fisicamente removidas. A amostra pode então ser armazenada até ser necessária. A amostra pode então ser usada sem ácido nucleico de bloqueamento adicional, ou pode talvez melhorar-se o seu contraste de manchamento por meio de bloqueamento adicional.

3C.ii. Reacção com ácido nucleico imobilizado. A remoção de sequências particulares pode também ser levada a cabo juntando-se sequências de ácido nucleico de cadeia única "absorvente" a um suporte sólido. O ácido nucleico de cadeia única, base, é hibridizado para o ácido nucleico hibridizado. Depois da hibridização, as sequências não ligadas são recolhidas e usadas como amostra. Por exemplo, pode ser usado ADN genómico humano para absorver sequências repetitivas de amostras humanas. Tal método é descrito por Brison et al., "General Method for Cloning Amplified DNA by Differential Screening With Genomic Probes", Molecular and Cellular Biology, Vol. 2, pag. 578-587 (1982). Deste modo, tal referência é incorporada aqui por referência. Em resumo, liga-se ADN genómico humano minimamente partilhado a diazónio-celulose ou um suporte semelhante. O ADN de fonte, apropriadamente cortado em fragmentos, é hibridizado contra o ADN imobilizado para valores de Cot na gama de cerca de 1 a 100. O aspecto preferido das condições de hibridização pode variar dependendo da composição de base do ADN. O tal processo pode remover sequências repetitivas das livrarias de cromossomas específicos, por exemplo, os da Tabela I, para produzir uma amostra capaz de manchar um cromossoma humano inteiro.



3d. Bloqueamento de sequências não sinalizadas no genoma sinalizado

O bloqueamento de locais de ligação não-sinalizados no genoma sinalizado por meio da hibridização com sequências complementares não marcadas impedirá a ligação de sequências marcadas na amostra, que têm o potencial de se ligar a esses locais. Por exemplo, a hibridização com ADN genômico não marcado tornará as sequências repetitivas de cópia elevada no genoma de sinal de cadeia dupla. As cópias marcadas dessas sequências na amostra não poderão ligar-se quando a amostra é subsequentemente aplicada.

Na prática, combinam-se vários mecanismos para produzir o contraste de manchamento. Por exemplo, quando se adiciona ADN de bloqueamento à amostra tal como em 3b acima, esses que permanecem de cadeia única quando a amostra é aplicada ao sinal podem ligar-se a e bloquear as sequências de sinal. Se a incubação da amostra com o ADN de bloqueamento for mínima, então o ADN genômico bloqueia simultaneamente a amostra e compete com a amostra para ligar os locais no sinal.

3e. Conceito de Q. Tal como se mencionou em 3b.i. acima, torna-se necessário adicionar a quantidade correcta de ADN genômico para se conseguir o melhor compromisso entre a inibição de capacidade de hibridização de repetições de cópia elevada na amostra e a redução da intensidade de sinal desejado, inibindo a ligação das sequências de sinal específicas. A discussão seguinte refere-se ao uso de ADN genômico de bloqueamento com amostras produzidas por clonagem ou outros processos de réplica do ADN da região do sinal do genoma. Deste modo, a amostra contém uma amostragem representativa das sequências repetitivas de cópia única, de cromossomas específicas, e se-

W. F. A. A.

quências repetitivas partilhadas no sinal. Uma tal amostra pode variar em complexidade desde 100 kb de sequência derivada de uma pequena região do genoma, por exemplo, vários clones de cosmídios pouco espaçados; até muitos milhões de bases, por exemplo, uma combinação de livrarias múltiplas de Tabela I. A discussão abaixo é ilustrativa e pode ser alargada a outras situações em que são usados diferentes ácidos nucleicos de bloqueamento. A discussão seguinte de Q é designada apenas para dar as linhas gerais em geral de forma como se deve proceder.

A adição de ADN genómico não marcado a uma mistura de hibridização contendo as sequências de marcadas, aumenta a concentração de todas as sequências, mas aumenta a concentração das sequências partilhadas por um factor maior do que a concentração das sequências de sinal específicas, uma vez que as sequências partilhadas se encontram algures no genoma, enquanto que as sequências de sinal específicas não estão. Deste modo, a reassociação das sequências partilhadas é de preferência aumentada a fim de que a hibridização das cópias marcadas das sequências partilhadas para o sinal seja de preferência inibido.

Para quantificar este conceito, considere-se primeiro uma das sequências, repetição ou cópia única, que hibridiza especificamente para o cromossoma i th numa mistura de hibridização contendo um m_p de massa do ADN amostra da livraria de cromossoma i th da Tabela I (por exemplo) e m_g de ADN genómico não marcado. O número de cópias marcadas da sequência é proporcional a m_p . Contudo, o número de cópias não marcadas é proporcional a $f_i m_g$, em que f_i é uma fracção de ADN genómico contido no cromossoma i th. Assim, a proporção de cópias não marcadas para as cópias marcadas de cada uma das sequências específicas para o cromossoma de sinal é $f_i m_g / m_p$, que aqui é definido com o Q . Para os cromossomas humanos normais $0,016 \leq f_i \leq 0,08$.

Wifama

(Mendelshon et al., Science, 179:1126 (1973))7. Para os exemplos representativos descritos na Secção VI.B (abaixo) $f_4 = 0,066$ e $f_{21} = 0,016$. Para uma amostra sinalizada numa região compreendida dos pares da base L, $f_1 = L/G$ em que G é o número dos pares de base num genoma (aproximadamente 3×10^9 bases para os humanos e outros mamíferos). Deste modo, $Q = (L/G) (m_b/m_p)$.

Considere-se agora uma sequência partilhada que esteja distribuída mais ou menos uniformemente no genoma por exemplo, o Alu. O número de cópias marcadas é proporcional a m_p , enquanto que o número de cópias não marcadas é proporcional a m_b . Deste modo, a proporção de cópias não marcadas para as cópias marcadas é $m_b/m_p = Q/f_1$. Isto é verdadeiro para todas as sequências uniformemente distribuídas, independentemente do número de cópias. Assim, a adição de ADN genómico aumenta a concentração de cada sequência específica pelo factor $1 + Q$, enquanto que cada sequência uniformemente distribuída é aumentada pelo factor maior $1 + Q/f_1$. Assim, as taxas de reassociação das sequências partilhadas são aumentadas por um factor maior do que as das sequências específicas através da adição de ADN genómico.

Pode mostrar-se que quase metade do efeito benéfico do ADN genómico em taxas de reassociação relativas é conseguido quando $Q = 1$ e por $Q = 5$ não há essencialmente maior benefício a ganhar com outros aumentos. Deste modo, as hibridizações do protocolo I da Secção VI.B abaixo mantém $Q \leq 5$.

Para ilustrar o uso do ADN de bloqueamento genómico, é conveniente considerar um modelo de um genoma em que 50 % do ADN compreenda sequências específicas (quer repetitivas quer de cópia única) e os outros 50 % do ADN compreende sequências repetitivas partilhadas que estão uniformemente distribuídas

no genoma. Assim, de acordo com o modelo, se o sinal for em bases L (quer dizer, a amostra contém fragmentos representando bases L da área de sinal ou áreas de sinal do genoma), as sequências contendo bases L/2 serão específicas para o sinal e o L/2 será partilhado com todo o genoma.

III. Marcacão dos Fragmentos de Ácido Nucleico de Mistura Heterogénea

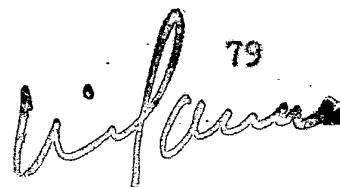
Existem várias técnicas para a marcação de fragmentos de ácido nucleico de cadeia única e dupla, da mistura heterogénea. Estas incluem a incorporação de etiquetas radioactivas, por exemplo, Harper et al., Chromosoma, Vol. 83, pag. 431-439 (1984); a ligação directa de fluorocromos ou enzimas, por exemplo Smith et al., Nucleic Acids Research, Vol. 13, pag. 2399-2412 (1985), e Connolly et al., Nucleic Acids Research, Vol. 13, pag. 4485-4502 (1985); e várias modificações químicas dos fragmentos de ácido nucleico que o tornam detectável imunoquimicamente ou por outras reacções de afinidade por exemplo, Tchen et al., "Chemically Modified Nucleic Acids as Immunodetectable Probes in Hybridization Experiments", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, pag. 3466-3470 (1984); Richardson et al., "Biotin and Fluorescent Labeling of RNA Using T4 RNA Ligase", Nucleic Acids Research, Vol. 11, pag. 6167-6184 (1983); Langer et al., "Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 78, pag. 6633-6637 (1981); Brigati et al., "Detection of Viral Genomes in Cultured Cells and Paraffin-Embedded Tissue Sections Using Biotin-Labeled Hybridization Probes", Virology, Vol. 126, pag. 32-50 (1983); Broter et al., "Electron Microscopic Visualization of tRNA Genes with Ferritin-Avidin:Biotin Labels", Nucleic Acids Research, Vol. 5, pag. 363-384 (1978); Bayer et al., "The Use of the Avidin Bio-

tin Complex as a Tool in Molecular Biology"; Methods of Biochemical Analysis, Vol. 26, pag. 1-45 (1980) Kuhlmann, Immunoenzyme Techniques in Cytochemistry (Wenihelm, Basel, 1984). Langer-Safer et al., PNSA USA, 79:4381 (1982); Landegent et al., Exp. Cell Res., 153:61 (1984); e Hopman et al., Exp. Cell Res., 169:357 (1987).

Os meios de marcação exemplares incluem aqueles em que os fragmentos de amostra são biotinilados, modificados com N-acetoxi-N-2-acetilaminofluoreno, modificado com isotiocianato de fluoresceína, modificado com ligante de mercúrio/TNP, sulfonado, digoxigenado ou contém dímeros T-T.

A "característica chave" é de que a amostra ligada ao sinal seja detectável. Nalguns casos, pode ser explorada para este fim uma característica intrínseca do ácido nucleico de amostra mais do que uma característica adicionada. Por exemplo demonstrou-se que os anticorpos que reconhecem especificamente os duplos RNA/ADN têm a capacidade de reconhecer amostras feitas de RNA que estão ligadas ao sinal ADN /Rudkin e Stollar, Nature, 265:472-473 (1977)7. O RNA usado para as referidas amostras não é modificado. Os fragmentos de ácido nucleico de amostra podem ser aumentados adicionando "caudas" de nucleótidos modificados ou de nucleótidos normais particulares. Quando é usada uma cauda de um nucleótido normal, uma segunda hibridização com ácido nucleico complementar da cauda e contendo fluoróforos, enzimas, radioactividade, bases modificadas, entre outros meios de marcação, permite a detecção da amostra ligada. O referido sistema pode ser comercialmente obtido da Enzo Biochem (Biobridge Labeling System; Enzo Biochem Inc., Nova Iorque, N.Y.).

Um outro exemplo de um meio para visualizar a amostra ligada, em que as sequências de ácido nucleico na amostra não contém



nenhum constituinte modificado, consiste no uso de anticorpos para os dímeros de timidina. Nakame et al., 20 (2): 229 (1987), ilustra esse método em que foi usado ADN de timina-timina dimerizado (T-T ADN) como marcador para a hibridização in situ. O T-T ADN hibridizado foi detectado imunohistoquimicamente usando um anti-T-T ADN de coelho.

Todas as técnicas de marcação referidas nas referências acima, podem ser preferidas, de acordo com circunstâncias particulares. Deste modo, as referências acima citadas são incorporadas por referência. Além disso, poderão ser úteis quaisquer técnicas de marcação conhecidas pelos peritos na matéria, para marcar as composições de coloração da presente invenção. Existem vários factores que determinam a escolha dos meios de marcação, incluindo o efeito de marca na média de hibridização e a ligação dos fragmentos de ácido nucleico ao ADN cromossómico, a acessibilidade de amostra ligada aos agrupamentos de marcação aplicados depois da hibridização inicial, a compatibilidade mútua dos agrupamentos de marcação, a natureza e intensidade do sinal gerado pela marca, a despesa e facilidade em que a amostra é aplicada e semelhantes.

Podem ser usadas simultaneamente várias amostras diferentes de elevada complexidade, cada uma delas marcada por um método diferente. A ligação de amorastas diferentes podem assim ser distinguida, por exemplo, por meio de cores diferentes.

IV - Hibridização in Situ

A aplicação da mistura heterogênea da presente invenção aos cromossomas é levado a cabo por meio de técnicas de hibridização in situ. Existem vários guias excelentes para a técnica, por exemplo, Gall e Pardue, "Nucleic Acid Hybridization in

80
Wifama

— Cytological Preparations", Methods in Enzymology, Vol. 21, pag. 470-480 (1981); Henderson, "Cytological Hybridization to Mammalian Chromo-Somes", International Review of Cytology, Vol. 76, pag. 1-46 (1982); e Angerer, et al., "In Situ Hybridization to Cellular RNAs", in Genetic Engineering: Principles and Methods, Sefton and Hollaender. Eds. Vol. 7, pag. 43-65 (Plenum Press, Nova Iorque, 1985). Deste modo, estas referências são incorporadas por referência.

Três factores influenciam a sensibilidade de coloração das amostras de hibridização, são elas: (1) eficácia da hibridização (fracção do ADN de sinal que pode ser hibridizada pela amostra), (2) eficácia da detecção (i.e., a quantidade de sinal visível que pode ser obtido de uma dada quantidade de amostra de hibridização), e (3) nível de ruído produzido pela ligação não específica da amostra ou dos componentes do sistema de detecção.

Em geral, a hibridização in situ compreende as fases principais seguintes:

- (1) fixação do tecido ou estrutura biológica a ser examinada;
- (2) tratamento de pré-hibridização da estrutura biológica para aumentar a acessibilidade do ADN pretendida e reduzir a ligação não-específica, (3) hibridização da mistura heterogénea da amostra para o ADN na estrutura biológica ou tecido;
- (4) lavagens de pós-hibridização para remover a amostra não ligado em híbridos específicos, e (5) das amostras hibridizadas da mistura heterogénea. Os reagentes usados em cada uma destas fases e as condições de uso dos mesmos varia, dependendo da situação em particular.

— Os comentários seguintes têm como objectivo servir de guia pa-

ra a aplicação das fases gerais acima mencionadas. Poderá ser necessário alguma experimentação para estabelecer as condições de coloração óptimas para as aplicações em particular.

Na preparação para a hibridização, a amostra, independentemente do método da sua produção, pode ser cortada em fragmentos do tamanho apropriado para se obter a melhor intensidade e especificidade de hibridização. Como linhas gerais em relação ao tamanho dos fragmentos, será necessário reconhecer que, se os fragmentos forem demasiado longos, não poderão penetrar no sinal para a ligação e, em vez disso formam agregados que contribuem para o ruído de fundo para a hibridização; contudo, se os fragmentos forem demasiado curtos a intensidade do sinal é reduzida.

De acordo com as condições de hibridização exemplificadas na Secção VI.B, em que é usado ADN genómico humano como agente para bloquear a capacidade de hibridização das sequências repetitivas partilhadas de cópia elevada, a média de tamanho preparado dos fragmentos de amostra situa-se entre cerca de 200 bases e cerca de 2 000 bases, mais preferivelmente na proximidade de 1 kb. Quando o tamanho dos fragmentos de amostra se situa na gama entre cerca de 800 bases e cerca de 1 000 bases, a temperatura de hibridização preferida é de cerca de 30°C e cerca de 45°C, mais preferivelmente entre cerca de 35°C e cerca de 40°C e ainda mais preferivelmente de cerca de 37°C; a média da temperatura de lavagem preferida é entre cerca de 40°C e cerca de 50°C e mais preferivelmente de cerca de 45°C.

O tamanho dos fragmentos de amostra é verificado antes da hibridização para o sinal; de preferência, o tamanho dos fragmentos é controlado por electroforese, mais preferivelmente por electroforese de desnaturamento de gel de agarose.

Wifama

Os agentes de fixação incluem soluções de álcool ácidas, soluções de acetona ácidas, reagente de Petrunkevitch, e vários aldeídos tais como o formaldeído, paraformaldeído, glutaraldeído, ou semelhantes. De preferência, usam-se soluções de etanol-ácido acético ou soluções de metanol-ácido acético em proporções de cerca de 3 : 1, para fixar os cromossomas em toa-lhas de metafase. Para células ou cromossomas em suspensão, é útil um processo de fixação descrito por Trask et al., in Science, Vol. 230, pag. 1401-1402 (1985). Deste modo, Trask et al., é aqui incorporado por referência. Em resumo, adicionam-se K_2CO_3 e dimetilsulberimidato (DMS) (de uma solução de armazenagem 5 x concentrado, misturada imediatamente antes de ser usada) a uma suspensão contendo cerca de 5×10^6 mídios/ml. As concentrações finais de K_2CO_3 , e DMS são de 20 mM e 3 mM, respectivamente. Depois de 15 minutos a $25^\circ C$, ajusta-se o pH de 10,0 para 8,0 através de adição de 50 microlitros de ácido cítrico 100 mM por mililitro de suspensão. Lavam-se os núcleos uma vez por centrifugação (300 g, 10 minutos, $4^\circ C$ em KCl 50 mM, tampão Hepes 5 mM, a um pH de 9,0 e $MgSO_4$ 10 mM).

Um processo de fixação preferido para as células ou núcleos em suspensão é descrito por Trask et al., Mum. Genet., 78: 251-259 (1988), artigo esse que é aqui incorporado por referência. Em resumo, fixam-se núcleos durante cerca de 10 minutos, à temperatura ambiente em paraformaldeído a 1% em PBS, $MgSO_4$ 50 mM, pH 7,6 e lavaram-se duas vezes. Ressuspendem-se os núcleos num tampão de isolamento (IB) (KCl 50 mM, HEPES 5 mM, $MgSO_4$ 10 mM, ditioeritritol 3 mM, 0,15 mg/ml de RNase, pH 8,0) / 0,05 % Triton X-100 a 10^6 /ml.

Frequentemente, antes da hibridização in situ, os cromossomas são tratados com agentes para remover proteínas. Os referidos agentes incluem enzimas ou ácidos doces. O pronase, pepsina ou a proteinase K são enzimas frequentemente usadas. Um trata-

W. F. Lima 83

mento de ácido representativo é a 0,02 - 0,2 N HCl, seguido de lavagens a temperatura elevada (por exemplo, 70°C). A otimização da desproteínização requer uma combinação de concentração de protease e um tempo de digestão que maximiza a hibridização, mas não cause uma perda inaceitável de pormenor morfológico. As condições óptimas variam de acordo com os tipos de tecido e o método de fixação. Pode ser útil uma fixação adicional depois do tratamento de protease. Deste modo, para aplicações particulares, pode ser necessária alguma experimentação para otimizar o tratamento de protease.

Em alguns casos, pode ser desejável o pré-tratamento com RNase para remover o RNA residual do sinal. A referida remoção pode ser realizada por meio de incubação dos cromossomas fixos em 50-100 microgramas/mililitro de RNase em 2 x SSC (em que SSC é uma solução de NaCl 0,15 M e citrato de sódio 0,015 M) por um período de 1-2 horas, à temperatura ambiente.

A fase de hibridização das amostras da mistura de amostras heterogêneas para o ADN cromossômico, envolve (1) a desnaturação do ADN pretendido a fim de que as amostras possam ganhar o acesso a regiões de cadeia única complementares, e (2) a aplicação da mistura heterogênea em condições que permitam que as amostras se juntem a regiões complementares no sinal. Os métodos para a desnaturação incluem a incubação na presença de pH elevado, de pH baixo, a temperatura elevada, ou de dissolventes orgânicos tais como a formamida, halogenetos de tetralquilamônio, ou semelhantes, em várias combinações de concentração e temperatura. O ADN de cadeia única no sinal pode também ser produzido com enzimas, tais como, Exonuclease III (van Dekken et al., Chromosoma (Berl) 97:1-5 (1988)). O processo de desnaturação preferido consiste na incubação durante um período de tempo entre 1-10 minutos em formamida, a uma concentração entre cerca de 35-95 por cento em 2 x SSC e

a uma temperatura entre cerca de 25 - 70°C. A determinação do tempo de incubação óptimo, concentração e temperatura dentro destas médias, depende de várias variantes, incluindo o método de fixação e o tipo de ácido nucleico de amostra (por exemplo, ADN ou RNA).

Depois de o ADN cromossómico ser desnaturado, os agentes de desnaturação são tipicamente removidos antes da aplicação da mistura heterogénea de amostra. Quando a formamida e o calor são os agentes de desnaturação principais, a remoção é convenientemente realizada com várias lavagens com um dissolvente, dissolvente esse que é frequentemente arrefecido, tal como uma série de etanol frio a 70 %, 80 %, e 100 %. Alternativamente, a composição do desnaturante pode ser ajustado conforme apropriado, para a hibridização in situ, por meio da adição de outros constituintes ou lavagens em soluções apropriadas. O ácido nucleico de amostra e de sinal podem ser desnaturados simultaneamente aplicando a mistura de hibridização e depois aquecendo-a à temperatura apropriada.

As condições físico-químicas ambientais do ADN cromossómico e da amostra durante o tempo em que a mistura heterogénea é aplicada, são aqui referidas como as condições de hibridização ou condições de tempêro. As condições de hibridização óptimas para aplicações particulares podem ser ajustadas por meio de vários factores de controlo incluindo a concentração dos constituintes, tempo de incubação dos cromossomas na mistura heterogénea, e as concentrações, complexidade e comprimentos dos fragmentos de ácido nucleico que formam a mistura heterogénea. De uma maneira geral, as condições de hibridização têm de ser suficientemente próximas da temperatura de fusão para minimizar a ligação não-específica. Por outro lado, as condições não podem ser tão rigorosas de forma a reduzir-se as hibridizações correctas de sequências complementares abaixo de

níveis detectáveis ou a requerer tempos de incubação excessivamente longos.

As concentrações de ácido nucleico na mistura de hibridização é uma variável importante. As concentrações têm de ser elevadas o suficiente para que a hibridização suficiente dos respectivos locais de ligação cromossômicos ocorra num espaço de tempo razoável (por exemplo, dentro de horas até vários dias). Deverão ser evitadas concentrações mais elevadas do que as necessárias para atingir sinais adequados a fim de que seja minimizada a ligação não-específica. Uma restrição prática importante na concentração de ácido nucleico na amostra na mistura heterogênea é a solubilidade. Existem ligações superiores no que respeita à concentração dos fragmentos, i.e., o comprimento da unidade de ácido nucleico por volume de unidade, que podem ser mantidas na solução e hibridizar de forma efectiva.

Nos Exemplos de representação descritos na Secção VI.B (abaixo) a concentração total de ADN na mistura de hibridização tinha um limite superior na ordem de 1 ng/ml. Foram usadas para esse manejamento de cromossomas total concentrações de amostra na gama de 1-20 ng/ml. A quantidade de ADN genómico de bloqueamento foi ajustada de forma a que Q fosse inferior a 5. Na extremidade baixa da concentração de amostra, foram obtidos sinais adequados com uma incubação de uma hora, quer dizer, um período de tempo em que a amostra e o ADN de bloqueamento são mantidos juntamente antes da aplicação ao material sinalizado, para bloquear as sequências de cópia elevada e uma hibridização de 16 horas. Eram visíveis sinais depois de duas horas de hibridização. Os melhores resultados (sinais claros (brilhantes) com o maior contraste) ocorreram depois de uma hibridização de 100 horas, o que deu às sequências específicas sinalizadas de cópia baixa mais oportunidade para

— descobrir locais de ligação. Na extremidade elevada da concentração da amostra obtêm-se sinais claros depois de hibridizações de 16 horas ou menos; o contraste foi reduzido uma vez que foram incluídas na amostra mais sequências repetitivas marcadas.

O objecto sinalizado fixado pode ser tratado de várias maneiras quer durante quer depois da fase de hibridização para reduzir a ligação não-específica do ADN da amostra. Tais tratamentos incluem a adição de ADN não-amostra ou "agente veicular" à mistura heterogênea, usando soluções de revestimento, tal como uma solução de Denhardt's (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 23, pag. 641-645 (1966), com a mistura heterogênea, incluindo durante vários minutos, por exemplo, 5-20 em dissolventes desnaturantes, a uma temperatura compreendida entre 5 - 10°C acima da temperatura de hibridização, e no caso de amostras de RNA, com tratamento suave com RNase de cadeia única (por exemplo, 5-10 microgramas por mililitro de RNase) em 2 x SSC à temperatura ambiente, durante 1 hora).

V. Reagentes de Coloração de Cromossomas Específicos Compreendendo Sequências de Cópia Única Selecionadas

V.A. Preparação e Uso de um Reagente de Coloração Específico para o Cromossoma Humano 21

V.A.1. Isolamento do Cromossoma 21 e Construção de uma biblioteca Específica do Cromossoma 21.

Os fragmentos de ADN das bibliotecas específicas de cromossomas humanos podem ser obtidos do National Laboratory Gene Library Project através da American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. Os fragmentos de ADN do cromossoma 21

Wifana⁸⁷

foram gerados pelo processo descrito por Fuscoe et al., in "Construction of Fifteen Human Chromosome-Specific DNA Libraries from Flow-Purified Chromosomes", Cytogenet. Cell. Genet., Vol. 43, pag. 79-86 (1986), cuja referência é aqui incorporada por referência. Em resumo, estabeleceu-se uma cultura de fibroblastos diploides humanos, a partir de tecido de prepúcio novo. Os cromossomas das células foram isolados pelo método K_2SO_4 de van den Engle et al., Cytometry, Vol. 5, pag. 108-123 (1984) e manchadas com tinta fluorescente Hoechst 33258 e Chromomycin 43. O cromossoma 21 foi purificado no classificador de alta velocidade de Lawrence Livermore National Laboratory, descrito por Peters et al., Cytometry, Vol. 6, pag. 290-301 (1985).

Depois da classificação, as concentrações de cromossomas era de aproximadamente 4×10^5 / ml. Por isso, antes da extração do ADN, os cromossomas ($0,2 - 1,0 \times 10^6$) foram concentrados por centrifugação a $40\,000 \times g$ durante 30 minutos, a 4°C . A pastilha foi depois novamente suspensa em 100 microlitros de tampão de isolamento de ADN (NaCl 15 mM, EDTA 100mM, TrisHCl 10 mM, pH 8,0) contendo SDS a 0,5 % e 100 microgramas/ml de proteinase K. Depois de incubação durante a noite a 37°C , as proteínas foram extraídas duas vezes com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Devido às pequenas quantidades de ADN, cada uma das fases orgânicas foi reextraída com uma pequena quantidade de Tris 10 mM pH 8,0, EDTA (TE) 1 mM.

Wifama⁸⁸

As camadas aquosas foram combinadas e transferidas para uma membrana de Schleicher e Schuell mini-coloidiana (# UH 020/25) e dializadas à temperatura ambiente contra TE durante 6-8 horas. A solução de ADN purificada foi depois digerida com 50 unidades de HindIII (Bethesda Research Laboratories, Inc.), em NaCl 50 mM, HCl Tris 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM e ditiotritol 1 mM. Depois de 4 horas a 37°, parou-se a reacção por meio de extracções com fenol e clorofórmio tal como se descreveu acima. Dializou-se a fase aquosa com água, durante a noite, a 4° num saco de minicolóidio e depois ajustaram-se 2 microgramas de braços Charon 21A com HindIII e trataram-se com fosfatase alcalina de vitelo (Boehringer Mannheim). Concentrou-se esta solução sob vácuo para um volume de 50 - 1000 microlitros e transferiram-se para um tubo de microcentrifugação de 0,5 ml em que o ADN precipitou com um décimo de volume acetato de sódio 3 M, pH 5,0 e 2 volumes de etanol. O precipitado foi recolhido por centrifugação, lavado com etanol frio a 70 % e dissolvido em 10 microlitros de TE.

Depois de se deixar dissolver o ADN durante várias horas, adicionou-se 1 microlitro de tampão de 10 x ligase, (HCl Tris 0,5 M pH 7,4, MgCl₂ 0,1 M, ditiotritol 0,1 M, ATP 10 mM, albumina de solo de bovino 1 mg/ml), e 1 unidade de ligase T4 (Bethesda Research Laboratory, Inc). Incubou-se a reacção de ligação a 10°C durante 16-20 horas e empacotaram-se 3 microlitros de aliquotas em partículas de fage, usando extractos in vitro preparados de cadeias de Coli E BHB 2688 e BHB 2690, descritos por Hohn in Methods in Enzymology, Vol. 68, pag. 299-309 (1979) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory New York, 1982).

Em resumo, prepararam-se ambos os extractos por tratamento com ultrassons e combinaram-se ao mesmo tempo empacotando-os in vivo. Estes extratos continham ADN lambda do tipo natural com

89
Wifama

uma eficiência de $1-5 \times 10^8$ de unidades de formação de placas por micrograma (pfu). As fages resultantes foram amplificadas em E. Coli LE 392 a uma densidade de aproximadamente 10^4 pfu/150 mm de preto, durante 8 horas para impedir as placas de crescerem juntamente e para minimizar as diferenças em taxas de crescimento de recombinante diferentes. Eluíram-se as fages de agar em 10 ml de tampão SM (HCl Tris 50 mM pH 7,5, Mg-SO₄ 10 mM, NaCl 100 mM, 0,01 % de gelatina) por placa alagando suavemente a 4°C durante 12 horas. As placas foram novamente enxaguadas com mais 4 ml de SM. Depois de se peletizarem os resíduos celulares a suspensão de fage foi armazenada com clorofórmio a 4°C.

V.A.2. Construção e Uso do Cromossoma 21- Mancha Específica
Para o Cromossoma de Coloração 21 dos Linfócitos Humanos

Isolam-se clones com inserções de sequência única por meio do método de Benton and Davis, Science, Vol 196, pag. 180-182 (1977). Em resumo, isolam-se cerca de 1000 fages recombinantes ao acaso da biblioteca do cromossoma 21 específico. Transferem-se estes para nitrocelulose e ensaiam-se com ADN humano genômico total transladado.

Dos clones que não revelam uma forte hibridização, cerca de 300 são furados que contêm ADN aparente de sequência única. Depois de os clones seleccionados terem sido amplificados a inserção do cromossoma 21 em cada clone é marcado com 32p e hibridizado para manchas de Southern de ADN genômico humano digerido com a mesma enzima usada para construir a biblioteca do cromossoma 21, isto é, o Hind III. A sequência única que contém os é reconhecida como aqueles que produzem uma única

banda durante a análise de Southern. De uma forma geral, seleccionam-se 100 desses clones para a mistura heterogênea. Os clones de sequência única são amplificados, as inserções são removidas por meio de digestão de Hind III e as inserções são separadas dos braços de fage por meio de electroforese de gel. Os fragmentos de ADN da amostra (isto é, as inserções de sequência única) são removidos do gel e são biotinilados por transferência de correspondência (por exemplo, por meio de um estojo que pode ser obtido da Bethesda Research Laboratories). Os fragmentos de ADN marcados são separados da reacção de transferência de correspondência usando pequenas colunas giratórias feitas em tubos de Eppendorph de 0,5 ml, carregadas com Sephadex G-50 (meio) aumentado em Tris 50 mM, EDTA 1 mM, SDS a 0,1 %, a um pH de 7,5. Os cromossomas de linfócitos humanos são preparados seguindo Harper et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 78, pag. 4458-4460 (1981). As células de metafase e interfase foram lavadas 3 vezes em salina tamponada com fosfato, fixas em ácido acético-metanol (1 : 3) e gotejadas sobre películas de microscópio limpas. As películas são armazenadas numa atmosfera de azoto a -20°C.

As películas que contêm as células de interfase e/ou as sequências de metafase são removidas do azoto, aquecidas a 65°C durante 4 horas em ar, tratadas com RNase (100 microgramas/ml durante 1 hora a 37°C) e desidratadas numa série de etanol. Depois são tratadas com proteinase K (60 ng/ml a 37°C), durante 7,5 minutos) e desidratadas. Ajusta-se a concentração da proteinase K dependendo do tipo de célula e do lote de enzimas para que não fique na película seca quase nenhuma imagem microscópica de fase dos cromossomas. A mistura de hibridização consiste em (concentrações finais) 50 por cento de formamida, 2 x SSC, 10 por cento de sulfato de dextrano, 500 microgramas/ml de agente veicular ADN (ADN de esperma de arenque tratado com ultrassons) e 2,0 microgramas/ml de ADN específico

de cromossoma 21 marcado com biotina. Esta mistura é aplicada às películas a uma densidade de 3 microlitros/cm² sob uma cobertura de vidro e selada com argamassa de borracha. Depois da incubação durante a noite a 37°C, as películas são lavadas a 45°C (50 % de formamida- 2 x SSC, pH 7,3 vezes 3 minutos; seguido de 2 x SSC pH 7,5 vezes 2 minutos) e imersos em tampão BN (bicarbonato de Na 0,1 M, 0,05 por cento de NP-40, pH 8). Depois deste ponto não se deixam secar mais as películas.

As películas são removidas do tampão de BN e bloqueadas durante 5 minutos à temperatura ambiente com tampão BN contendo 5% de leite magro seco (Carnation) e 0,02 % de Na azida (5 microlitros/cm² em coberturas de plástico). Removem-se as coberturas e o líquido em excesso é sumariamente drenado, sendo aplicada fluoresceína-avidina DCS (3 microgramas/ml em tampão BN com 5 % de leite e 0,02 % de Na Azida (5 microlitros/cm²). Substituem-se as mesmas coberturas e as películas são incubadas durante 20 minutos a 37°C. As películas são depois lavadas 3 vezes durante 2 minutos de cada vez em tampão BN a 45°C. A intensidade da fluorescência ligada com a biotina é amplificada adicionando uma camada de anticorpo de anti-avidina de cabra biotinilada (5 microgramas/ml em tampão BN com 5 % de soro de cabra e Na Azida a 0,02 %). Seguida depois de lavagem tal como se referiu acima, por outra camada de DCS de fluoresceína-avidina. O DCS de fluoresceína-avidina, a anti-avidina de cabra e o soro de cabra podem todos ser obtidos no comércio, por exemplo, Vector Laboratories (Burlingame, C.A.). Depois de se lavar em BN, adiciona-se antes da observação uma solução anti-desvanecida de fluorescência, de p-fenilenodiamina (1,5 microlitros/cm² de cobertura). É importante manter esta camada fina para se obter uma imagem microscópica ótima. Este anti-definhante reduziu de forma significativa o definhamento (desaparecimento) da fluoresceína, permitindo a observação microscópica contínua até 5 minutos. As contra-manchas de ADN

(iodeto de propídio ou DAPI), estão incluídas nas contramanchas a 0,25 - 0,5 microgramas/ml.

É usado iodeto de propídio (PI) de tinta de ADN-específico de fluorescência vermelha para permitir a observação simultânea da amostra hibridizada e do ADN total. A fluoresceína e o PI são estimulados a 450-490 nm (combinação de filtro de Zeiss 487 709). Aumentando o comprimento de onda de estimulação para 546 nm (combinação do filtro de Zeiss 487 715) permite a observação do PI apenas. O DAPI, uma mancha específica de ADN de fluorescência azul, estimulado no ultravioleta (combinação de filtro de Zeiss 487 701) é usado como contramancha quando se observam separadamente o ADN marcado com diotina e o ADN total. Os cromossomas 21 de metafase são detectados por meio de pontos amarelos localizados ao acaso e distribuídos sobre todo o corpo do cromossoma.

V.3. Método Aperfeiçoado para a Seleção eficiente de sequências do Cromossoma 21 de Cópia Única

Fuscoe et al., Genomics 5:100-109 (1989) proporciona processos mais eficientes do que o método descrito anteriormente (V.A.2), para a seleção de grandes números de clones de sequência de cópia única ou de clones de sequência de número repetido de cópia muito baixa a partir de bibliotecas de fage recombinantes e demonstra o seu uso para manchar o cromossoma 21. O referido artigo é aqui incorporado por referência. Em resumo, seleccionaram-se clones da biblioteca charon 21A IL21NS02 (feita de ADN do cromossoma 11 humano) usando dois processos básicos. No primeiro, a biblioteca de fage foi seleccionada em duas fases usando métodos designados como sendo mais sensíveis à presença de sequências repetitivas nos clones do que o método da Secção V.A.2. Os clones seleccionados

93
Wifama

foram depois subclonados em plasmídios. As 450 inserções assim seleccionados formam a biblioteca pBS-U21. O segundo foi num processo de múltiplas etapas em que: 1) as inserções da LL21-MS02 foram subclonadas em plasmídios Bluescribe, 2) os plasmídios foram cultivados numa densidade elevada em colónias de bactérias em filtros de nitrocelulose e 3) foi hibridizado ADN genómico humano radioactivo para o ADN de plasmídio em filtros de nitrocelulose sob uma pressão baixa em 2 fases e 4) os plasmídios com inserções que não conseguiram hibridizar foram seleccionados como contendo potencialmente sequências de cópia única. Desta maneira foram obtidas mil quinhentas e trinta colónias para formar a biblioteca pBS-U21/1530.

A análise de Southern indicou que o segundo procedimento foi mais eficaz no reconhecimento da sequência repetitiva que o primeiro. A fluorescência na hibridização in situ com ADN de pBS-U21/1530 permitiu o manchamento específico intenso dos cromossomas número 21 em sequências de metafase feitas a partir de linfocitos humanos. A hibridização com pBS-U21 um menor manchamento específico do cromossoma 21. Os pormenores relativos ao método de Fuscoe et al., da selecção de sequências de cópia única ou de amostras de sequências de repetição muito baixa a partir de biblioteca recombinantes podem ser encontrados em Fuscoe et al., id.

V.C. Hibridização com uma Colecção de Sequências de Cópia Única do Cromossoma 4

Pinkel et al., PNAS (USA), 85:9138-9142 (Dezembro de 1988) descreve os processos para a preparação das sequências de cópia única do cromossoma 4 e depois um protocolo /modificação do processo descrito em Pinkel et al., PNAS (USA), 83:2934-2938 (1986) para a hibridização das referidas amostras de cópia

única para uma sequência de metafase humana. A Figura 4H mostra a hibridização com um conjunto de 120 amostras de cópia única de um cromossoma 4 para uma sequência de metafase humana.

VI. Incapacitação de Sequências Repetitivas Partilhadas

V.I.A. Manchamento específico do Cromossoma 21 usando ADN de Bloqueamento

Usaram-se concentrações elevadas de ADN genómico humano não marcado e ADN de lambda fage para inibir a ligação de sequências repetitivas e de vector ADN para os cromossomas pretendidos. A digestão de proteinase pesada e a subsequente fixação do sinal aumentaram o acesso das amostras ao ADN pretendido.

As sequências de metafase humanas foram preparadas em películas de microscópio com técnicas conhecidas e armazenadas imediatamente numa atmosfera de azoto a 20°C.

As películas foram removidas do congelador e deixaram-se aquecer para a temperatura ambiente numa atmosfera de azoto antes de se iniciar o processo de manchamento. As películas aquecidas foram primeiro tratadas com 0,6 microgramas/ml de proteinase K em tampão P (Tris 20 mM, CaCl_2 2 mM a pH 7,5) durante 7,5 minutos e lavadas uma vez em tampão P. A quantidade de proteinase K usada necessita de ser ajustada para diferentes colecções de películas. Depois de serem desnaturadas, as películas foram armazenadas em 2 x SSC. Preparou-se uma mistura de hibridização consistindo em 50 % de formamida, 10 % de sulfato de dextrano, 1 % de Tween 20, 2 x SSC, 0,5 mg/ml de ADN

genómico humano, 0,03 mg/ml de ADN lambda e 3 microgramas/ml de amostra de ADN marcada de biotina. O ADN de amostra consistia na fracção de densidade mais elevada de fage da biblioteca do fragmento Hind III do cromossoma 21 (número de acesso ATCC 57713), conforme determinado pelo gradiente de cloreto de cézio (O ADN de inserção e de fage de amostra foram ambos marcados por transferência de corte). O tamanho médio de inserção (quantidade de ADN de cromossoma 21) tal como determinado por meio de electroforese de gel era de cerca de 5 quilobases. Não foi efectuada qualquer tentativa para remover sequências repetitivas das inserções ou para isolar as inserções do vector de fage lambda. A mistura de hibridização foi desnaturada aquecendo a 70°C durante 5 minutos, seguido de incubação a 37°C durante 1 hora. A incubação permite que o ADN genómico humano e o ADN de lambda não marcado na mistura de hibridização bloqueiem as sequências repetitivas humanas e as sequências de vector na amostra.

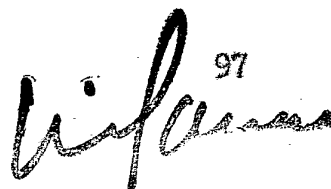
A película contendo a sequência de metafase humana foi removida da 2 x SSC e manchada a seco com papel de lente. A mistura de hibridização foi imediatamente aplicada à película, foi colocada numa cobertura de vidro na película com cola de borraça e a película foi incubada durante a noite a 37°C. Em seguida, a preparação das películas processou-se tal como se descreveu na Secção V.B. (aqui o ADN de cromossoma 21 foi manchado com fluoresceína e o ADN cromossómico total foi contra-manchado com DAPI). As Figuras 1A-C ilustram os resultados. A Figura 1A é uma imagem DAPI da sequência de metafase humana obtida com um sistema de análise de imagem computadorizada. É uma imagem binária que mostra tudo acima do valor a branco e o restante a preto. Os dados primários foram registados sob a forma de uma imagem de nível cinzento com 256 níveis de intensidade. (Os sulcos pequenos indicam os sítios do cromossoma 21S). A Figura 1B é uma imagem de fluoresceína da mesma sequên-

cia tal como na Figura 1A, novamente na forma binária. (Novamente, os pequenos sulcos indicam os sítios do cromossoma 21S). A Figura 1C ilustra as posições do cromossoma 21S depois de terem sido removidos objectos menos densamente manchados, por meio de técnicas de processamento de imagem conhecidas.

VI. B. Detecção da Trisomia 21 e de Translocações do Cromossoma 4 usando Bibliotecas de Plasmídeo Bluescribe

Tal como se ilustra na Secção VI.A., pode ser usada uma biblioteca de cromossomas específico humana, incluindo as suas sequências repetitivas partilhadas, para manchar esse cromossoma, se a capacidade de hibridização das sequências repetitivas partilhadas for reduzida por incubação com ADN genómico humano não marcado. Na Secção VI.A., as sequências de ácido nucleico da mistura heterogénea forem clonadas no vector de fage charon 21A, em que a proporção de inserção do ADN-vector é de cerca de 0,1 (4 kb de inserção média a 40 kb de vector). Nesta secção, demonstraremos que transferindo as mesmas inserções para um vector de clonação mais pequeno, o plasmídeo Bluescribe de cerca de 3 kb, que aumenta a proporção de inserção para o vector ADN para 0,5, aumentou a especificidade e a intensidade do manchamento.

Tal como se discutiu anteriormente, a incubação de amostra pode ser levada a cabo com a amostra apenas, com a amostra misturada com ADN genómico não marcado, 1 com a amostra misturada com ADN não marcado enriquecido em todo ou algumas sequências repetitivas partilhadas. Se for adicionado ADN genómico não marcado, então é importante adicionar em quantidade suficiente para incapacitar de forma suficiente as sequências repetitivas partilhadas na amostra. Contudo, o ADN genómico contém



também cópias não marcadas das sequências, cuja hibridização é desejada. Tal como se explicou acima, Q é aqui definido como a proporção de cópias não marcadas para cópias marcadas das sequências específicas de cromossomas na mistura de hibridização.

Pinkel et al., PNAS (USA), 85:9138-9142 (Dezembro de 1988) descreve o uso de ADN genómico não marcado para inibir de forma competitiva a hibridização dessas sequências numa biblioteca específica de cromossomas que sejam partilhadas com outros cromossomas. O referido trabalho descreve materiais e métodos para a hibridização de fluorescência in situ com bibliotecas específicas de cromossomas humanos [biblioteca do cromossoma 4 LLO4NSO2 subclonada em plasmídios Bluescribe (pBS-4); biblioteca de cromossoma 21 LL21NSO2 subclonada em plasmídios Bluescribe (pBS-21)]⁷. Os resultados dessas hibridizações estão referidos na Figura 4A-C e 4F e G.

VI.C. Hibridização de Cromossomas Artificiais de Fermentação (YACS) para Sequências de Metáfase Humanas

YACS. Sete clones de fermentação HY1, HY19, HY29, HYA1.A2, HYA3.H2, HYA3.A9 e HYA9.B6, foram obtidos de D. Burke (Washington University, St. Louis, MO). Os comprimentos do ADN humano nos clones variava entre cerca de 100 kb e cerca de 600 kb. A electroforese de gel foi levada a cabo para verificar o tamanho destas inserções. Cada um destes clones foi cultivada, tendo sido isolado o ADN total. O ADN isolado foi bitinilado por transferência por corte, a fim de que 10-30 % da timidina fosse substituída por biotina-11-dUTP. A concentração do ADN marcado total depois das transferências por corte é na média de 10-20 ng/ul.



ADN de bloqueamento- Trata-se ADN de placenta humana (Sigma) com proteinase K e extraiu-se com fenol e tratou-se por meio de ultrassons para uma média de tamanho de 200-600 bp. O ADN total isolado do fermento que não continha um cromossoma artificial foi tratado por ultrassons para uma média de tamanho semelhante. Ambos estes ADNs foram mantidos numa concentração de 1-10 ug/ul.

Hibridização de fluorescência in situ (FISH) A hibridização seguiu os processos de Pinkel et al., (1988), acima, com ligeiras modificações. Prepararam-se sequências de metafase a partir de culturas de metotrexato sincronizadas de acordo com os processos de Harper et al., PNAS (USA) 78:4458-4460, (1981). Fixaram-se células em metanol/ácido acético, (3 : 1), gotejaram-se sobre películas, secaram-se ao ar e armazenaram-se a -20°C sob um gás de azoto até serem usadas. As películas foram depois imersas dois minutos em 70 % de formamida/2 x SSC para demonstrar as sequências de ADN pretendidas, desidrataram-se numa série de 70-85-100 % de etanol e secaram-se ao ar (SSC é NaCl 0,15 M/Citrato de Na 0,015 M, pH 1). Adicionaram-se então à mistura de hibridização dez - 100 ug de ADN de fermentação biotinilado, e aproximadamente 1 ug de cada um de ADN de fermentação não marcado e ADN genómico humano (volume final 10 ul, composição final 50 % de formamida/2 x SSC/10 % de sulfato de dextrano), aqueceu-se a 70°C durante 5 minutos e depois incubou-se a 37°C, durante 1 hora para deixar reassociar as cadeias complementares das sequências mais altamente repetidas.

A mistura de hibridização foi depois aplicada à película (aproximadamente 4 cm² de área) e selada com argamassa de borracha sob uma cobertura de vidro. Depois da incubação durante a noite a 37°C, removeu-se a cobertura e lavou-se 3 vezes a película, em 3 minutos de cada vez em 50 % de formamida/2 x SSC a

42-45°C, e uma vez em tampão de PN /mistura de NaH_2PO_4 0,1 M e Na_2HPO_4 0,1 M para dar um pH de 8; 0,1 % Nonidet P-40 (Sigma)7. Detectou-se então a amostra ligada com incubação, alternadas de 20 minutos (temperatura ambiente em avidina-FITC e anticorpo de anti-avidina de cabra, ambos a 5 ug/ml em tampão PNM (tampão PN mais 5 % de leite seco magro, centrifugado para remover os sólidos; 0,02 % de Na azida7. Separaram-se a incubação de avidina e anti-avidina por meio de 3 lavagens de 3 minutos cada uma em tampão PN. Duas das três camadas de avidina foram aplicadas (a avidina, grau DCS, e anti-avidina de cabra biotinilada são obtidas de vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

A Figura 5 mostra a hibridização de HYA3.A2 (580 kb de ADN humano) para 12q21.1. A localização da hibridização foi estabelecida usando uma técnica de bandas fluorescente convencional empregando o processo DAPI / actinomicina D: Schweizer, "Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI", Chromosoma, 58:307-324 (1976). O sinal de hibridização forma uma banda ao longo da largura de cada um dos cromossomas 12, indicando a morfologia da embalagem de ADN nessa região do cromossoma.

As posições do clone YAC são atribuídas tal como se mostra na Tabela 2 abaixo.

T a b e l a 2

Hibridização do YAC de competição

<u>Clone YAC</u>	<u>tamanho da inserção</u>	<u>localização</u>
HY1	120	Xq23
HY19	450	8q23,3 21q21,1
HY29	500	14q12
HYA1.A2	250	6q16
HYA3.A2	580	12q21,1
HYA3.A9	600	14q21
HYA9.B6	280	1p36,2 3q22

VI.D. Hibridização com células Híbridas humanas/de Hamster

Foram usadas neste exemplo essencialmente as mesmas condições de hibridização e de manchamento que as referidas no processo de Pinkel et al., (1988), acima, e exemplificadas nas Secções V.C. e VI.B. acima. Neste exemplo misturaram-se 400 ng de ADN de biotina marcado de uma célula híbrida de hamster-humana que continha uma cópia do cromossoma 19 humano, com 1,9 ug de ADN genómico humano não marcado em 10 ul de mistura de hibri-

dização. A hibridização foi de aproximadamente 60 horas a 37° C. O manchamento fluorescente da amostra ligada e o contra-manchamento dos cromossomas foi como nos outros exemplos acima. A Figura 6 mostra os resultados da hibridização.

VII - Aplicação específicas

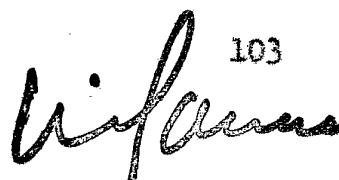
A presente invenção permite a detecção microscópica e em alguns casos a detecção citométrica de passagem de anormalidades genéticas numa base de célula após célula. A microscopia pode ser levada a cabo inteiramente por observadores humanos, ou inclui vários graus de instrumentos adicionais e assistência por computador até à automatização total. O uso de instrumentos e de automatização para tais análises oferece muitas vantagens. Entre elas encontram-se o uso de tintas fluorescentes que são invisíveis a observadores humanos (por exemplo, as tintas infravermelhas) e a oportunidade de interpretar os resultados obtidos com múltiplos métodos de marcação que poderiam não ser simultaneamente visíveis (por exemplo, combinações de manchas fluorescentes e de absorção, auto-radiografia, etc.). Podem ser usadas medições quantitativas para detectar as diferenças na coloração que não são detectáveis por observadores humanos. Tal como se descreve abaixo, a análise automatizada pode também aumentar a velocidade com a qual as células e os cromossomas podem ser analisadas.

Os tipos de anormalidades citogenéticas que podem ser detectadas com as amostras da presente invenção incluem: duplicação de todo ou parte de um tipo de cromossoma pode ser detectado como um aumento no número ou tamanho de domínios de hibridização distintos em sequências de metafase ou núcleos de interfase que se seguem à hibridização com uma amostra para esse tipo de cromossoma ou região, ou por um aumento da quantidade da

amostra ligada. Se a amostra for detectada por fluorescência, a quantidade da amostra ligada pode ser detectada ou por citometria de passagem ou por microscopia de fluorescência quantitativa. A anulação de um cromossoma inteiro ou de uma região de um cromossoma pode ser detectado como uma diminuição do número ou tamanho de domínios de hibridização distintos em sequências de metafase ou núcleos de interfase que seguem a hibridização com uma amostra para esse tipo ou região de cromossoma ou por uma diminuição da amostra ligada. Se a amostra for detectada por fluorescência, a quantidade ligada pode ser determinada ou por citometria de passagem ou por microscopia de fluorescência quantitativa. As translocações ou dicentros e as inversões podem ser detectados em sequências de metafase e núcleos de interfase por meio de justaposição anormal dos domínios de hibridização que estão normalmente separados a seguir à hibridização com amostras que flanqueiam ou alcançam a região ou regiões do cromossoma ou dos cromossomas que se encontram no ponto ou nos pontos de rearranjo. As translocações envolvem pelo menos dois tipos de cromossomas diferentes e resultam em cromossomas derivados que possuem apenas um centrómero cada um. Os dicêntricos (dicentros) envolvem pelo menos dois tipos de cromossoma diferentes e resultam em, pelo menos, um fragmento de cromossoma que necessita de um centrómero e um tendo dois centrómeros. As inversões envolvem a inversão de polaridade de um troço de um cromossoma.

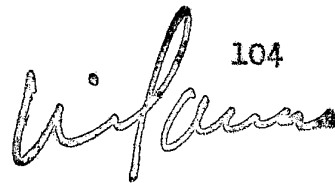
VII.A. Análise de Banda

Foi efectuado um esforço substancial durante os últimos trinta anos para desenvolver sistemas automatizados (em especial, microscópios controlados por computador) para a classificação automática de cromossomas e para a detecção de aberrações por meio de análise de sequências de metafase. Nos anos recentes,



foram desenvolvidos esforços dirigidos para a classificação automática de cromossomas que foram quimicamente manchados para produzirem modelos de bandas distintas nos vários tipos de cromossomas. Estes esforços foram apenas parcialmente bem sucedidos devido às diferenças subtis do modelo de manchamento entre tipos de cromossomas com aproximadamente o mesmo tamanho e devido ao facto de que a contracção diferencial dos cromossomas em diferentes sequências de metafase provoca uma mudança no número e na largura das bandas visíveis em cromossomas de cada tipo. A presente invenção ultrapassa estes problemas permitindo a construção de reagentes que produzem um modelo de manchamento cujas diferenças de espaço, largura e marcação (por exemplo cores diferentes) são optimizadas para facilitar a classificação automática de cromossomas e a detecção das aberrações. Isto é possível uma vez que se podem seleccionar amostras de hibridização conforme se desejar ao longo dos comprimentos dos cromossomas. O tamanho de uma banda produzida por um tal reagente pode variar entre um ponto pequeno apenas até uma cobertura substancialmente uniforme de um ou mais cromossomas totais. Assim, a presente invenção permite a construção de uma amostra de hibridização e o uso de meios de marcação, de preferência de fluorescência, de modo a que possam ser distinguidos domínios de hibridização adjacentes por exemplo, por cor, para que possam ser detectadas por meio de espectros bandas com espaços entre si demasiado pequenos para serem espaçadamente resolvidos, (isto é, se coalescerem bandas de fluorescência vermelhas e verdes, a presença das duas bandas pode ser detectada por meio de fluorescência amarela resultante).

A presente invenção permite também a construção de modelos de bandas designados para aplicações particulares. Deste modo, podem ser significativamente diferentes na mistura de espaço e cor, por exemplo, em cromossomas que sejam semelhantes na for-



ma e no tamanho em geral, e que tenham modelos de bandas semelhantes quando são usadas técnicas convencionais. O tamanho, forma e marcação (por exemplo cor) das bandas de hibridização produzidos pelas amostras da presente invenção podem ser optimizadas por forma a eliminar erros na selecção a fim de que se torne possível a detecção precisa automatizada da aberração. Este modelo de banda optimizado aumentará também de forma significativa a classificação visual de cromossomas e a detecção de aberração.

A facilidade de reconhecimento dos pontos de interrupção de translocação específicos pode ser aumentada usando um reagente intimamente ligado à região da interrupção. Por exemplo, pode ser usada uma amostra de elevada complexidade da presente invenção compreendendo sequências que hibridizam de ambos os lados de interrupção num cromossoma. O troço de amostra que se liga a um dos lados da interrupção pode ser detectado de maneira diferente daquele que se liga ao outro, por exemplo, com cores diferentes. Num modelo assim, um cromossoma normal terá diferentes regiões de hibridização coloridas umas ao lado das outras, podendo as referidas bandas aparecer todas muito próximas uma das outras. Uma interrupção poderá separar as amostras em diferentes cromossomas ou resultar em fragmentos cromossómicos e poderá ser visualizada muito separadamente numa média que seja feita.

VII.B. Dosimetria Biológica

Uma aproximação para a dosimetria biológica consiste em medir frequências de cromossomas estruturalmente aberrantes, como uma indicação da danificação genética sofrida por indivíduos expostos a agentes potencialmente tóxicos. Numerosos estudos indicaram o aumento nas frequências de aberrações estruturais

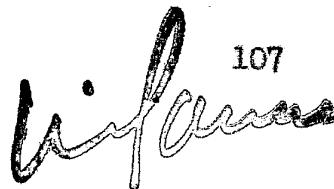
com o aumento da exposição a radiação ionizante e outros agentes denominados clastogênes. Os cromossomas dicêntricos são normalmente assinalados uma vez que a sua natureza distinta permite que os mesmos sejam assinalados rapidamente sem análise de bandas. A análise rápida é importante devido à baixa frequência dessas aberrações em indivíduos expostos aos níveis descobertos em pontos de trabalho ($\sim 2 \times 10^{-3}$ /células). Infelizmente, os dicêntricos não são retidos de forma estável pelo que a frequência dicêntrica medida diminui com o tempo depois da exposição. Deste modo, a exposição de nível baixo durante longos períodos de tempo não resulta numa frequência dicêntrica elevada devido ao aclaramento continuado destas aberrações. As translocações são aberrações melhores para serem assinaladas para os referidos estudos dosimétricos devido ao facto de ficarem retidas mais ou menos indefinidamente. Deste modo, a verificação do denogenético pode ser efectuada em tempos muito depois da exposição. As translocações não são habitualmente assinaladas para a dosimetria biológica devido ao facto de a dificuldade em reconhecer as mesmas torna a marcação de células suficientes para a dosimetria logisticamente impossível. A presente invenção elimina esta dificuldade. Especificamente, a hibridização com uma amostra que mancha de forma substancial uniformemente vários cromossomas (por exemplo, os cromossomas 1, 2, 3 e 4) permite a imediata identificação microscópica em sequências de metafase de aberrações estruturais que envolvem estes cromossomas. Os cromossomas normais aparecem completamente manchados ou não manchados pela amostra. Os cromossomas derivativos que resultam de translocações entre cromossomas sinalizados e não sinalizados são reconhecidos, como sendo apenas parcialmente manchados, figura 4D. Esses cromossomas parcialmente hibridizados podem ser imediatamente reconhecidos quer visualmente ao microscópio de forma automatizada usando microscopia auxiliada por computador. A discriminação entre as translocações e os dicêntricos é facilitado adicionando à amos-



tra sequências descobertas em todos os centrómeros dos cromossomas. A detecção dos componentes centroméricos da amostra com meios de marcação, por exemplo a cor, diferentes dos usados para detectar o resto dos elementos de amostra permite a identificação fácil dos centrómeros dos cromossomas que, por sua vez, facilita a discriminação entre os dicêntricos e as translocações. Esta tecnologia reduz de forma dramática o efeito de marcação requerido com as técnicas anteriores para que se torne fácil e possa ser possível examinar dezenas de milhares de sequências de metáfase tal como requerido para a dosimetria biológica de baixo nível.

VII.C. Diagnóstico Pré-natal

As aberrações mais comuns descobertas prenatalmente são trisomias que envolvem os cromossomas 21 (síndrome de Down), 18 (síndrome de Edward) e 13 (síndrome de Patan) e XO (síndrome de Turner), XXY (síndrome de Klinefelter) e a boença XYY. Ocorrem também aberrações estruturais. Contudo, são raras e o seu significado clínico é muitas vezes incerto. Deste modo, a importância de detecção destas aberrações é questionável. As técnicas correntes para obter células de fetos para a cariotipação convencional, tal como a aminocentese e a biópsia de yeld coriônica origina centenas de milhares de células para análise. Estas são usualmente cultivadas em culturas durante 2 a 5 semanas para produzirem células mitóticas suficientes para a análise citogenética. Uma vez preparadas as sequências de metáfase, são analisadas por meio de análise de bandas convencional. Esse processo só pode ser levado a cabo por analistas altamente técnicos sendo um processo moroso pelo que o número de análises que podem ser levadas a cabo de forma segura e dignas de confiança, mesmo pelos maiores laboratórios citogenéticos, é apenas de alguns milhares por ano. Como resultado, a



análise citogenética pré-natal é usualmente limitada a mulheres cujos filhos têm um elevado risco de doença genética (por exemplo a mulher com idade superior a 35 anos).

A presente invenção ultrapassa estas dificuldades permitindo a identificação simples e rápida de aberrações de cromossomas numéricas comuns em células de interfase sem cultura ou com uma cultura de células mínima. Especificamente, podem ser detectados números anormais de cromossomas 21, 18, 13, X e Y nos núcleos de interfase, contando os números de domínios de hibridização que se seguem à hibridização com amostras específicas para estes cromossomas (ou para importantes regiões dos mesmos tais como 21q22 para o síndrome de Down). Um domínio de hibridização é uma região compacta, distinta sobre a qual a intensidade de hibridização é elevada. Uma frequência aumentada de células mostrando três domínios (especificamente superior a 10 %) para os cromossomas 21, 18 e 13 indica a ocorrência dos síndromas de Down, Edward e Patau, respectivamente. Um aumento no número de células que mostram um domínio específico de X único e não mostram qualquer domínio específico de Y a seguir à hibridização com amostras específicas de X e Y indica a ocorrência do síndrome de Turner. Um aumento da frequência que mostra dois domínios específicos de X e um domínio específico de Y, indica o síndrome de Klinefelter e o aumento na frequência de células que mostram um domínio específico de X e dois domínios específicos de Y indicam um feto XYY. A contagem pode ser suplementada (ou nalguns casos substituída) pela medição da intensidade de hibridização usando, por exemplo, a microscopia de fluorescência quantitativa ou a citometria de passagens, uma vez que a intensidade de hibridização é aproximadamente proporcional ao número de cromossomas pretendidos para os quais a amostra é específica. As aberrações numéricas que envolvem vários cromossomas podem ser classificados simultaneamente detectando a hibridização dos cromossomas diferentes

com meios de marcação diferentes, por exemplo, por meio de cores diferentes. Estes processos de detecção de aberrações ultrapassam a necessidade da cultura extensiva de células requeridas pelos processos uma vez que todas as células na população podem ser classificadas. Elas eliminam a necessidade de analistas altamente técnicos devido à natureza simples e distinta das assinaturas de hibridização das aberrações numéricas. Além disso, são bem apropriadas para a análise automatizada das aberrações.

O facto de que as aberrações numéricas podem ser detectadas nos núcleos de interfase permite também a análise citogenética das células que normalmente não podem ser estimuladas de mitose. Especificamente, permitem a análise de células de fetos descobertas no sangue periférico materno. Tal característica é vantajosa uma vez que elimina a necessidade de amostragem invasiva de células de fetos, tal como a amniocentese ou a biopsia de vilos coriônico.

Tal como se indicou na técnica anterior, a região desses métodos de embrião invasivos serem necessários é de que a cariotipação convencional e a análise em bandas requiere cromossomas de metafase. Neste momento, não existem processos aceites para a cultura de células de fetos separadas do sangue materno para proporcionar uma população de células com cromossomas de metafase. Considerando que os reagentes de coloração de mancharmento da presente invenção podem ser empregues com núcleos de interfase da presente invenção proporciona um método invasivo não-embriológico para a cariotipação de cromossomas de fetos.

A primeira fase desse método consiste em separar células de fetos que tenham passado através da placenta ou que tenham sido derramados pela placenta para o sangue materno. A incidência das células de feto na corrente do sangue materno é muito

baixa, ou na ordem de 10^{-4} a 10^{-6} células/ml e bastante variável dependendo do tempo de gestação; contudo, podem distinguir-se células de fetos apropriadamente marcadas das células marcadas e concentradas, por exemplo, com uma saída de células a elevada velocidade.

A presença de células de um feto macho pode ser identificado por meio de uma marca, por exemplo uma chapa fluorescente, num reagente de coloração específico de cromossomas para o cromossoma Y. As células que eram aparentemente ou precursoras de linfócitos ou eritrócitos, que foram separadas do sangue materno revelaram ser Y-cromatina-positivas, [Zillacus et al., Scan, J. Haematol, 15:333 (1975); Parts e Herzenberg, Methods in Cell Biology, Vol. 10, pag. 277-295 (Academic Press, N.Y., 1982); e Liebers et al., Humangenetik, 28:273 (1975)].

Um método preferido para separar as células de fetos do sangue materno consiste no uso de anticorpos monoclonais que tenham preferencialmente afinidade para algum componente não presente nas células de sangue materno. As células de fetos podem ser detectadas por marcadores de HLA (antigene de leucócito humano) paterno ou por um antigene na superfície das células de fetos. Os processos imunológicos preferidos para distinguir entre os leucócitos de fetos e os leucócitos maternos com base na diferenciação do tipo de HLA, usa as diferenças dos locais HLA-A2, HLA-A3 e HLA-B3 e ainda preferido no local HLA-A2. Além disso, o primeiro e segundo trofoblastos de fetos do primeiro e segundo trimestre podem ser marcados com anticorpos contra a citoqueratina celular, interna constituinte, que não se encontra presente nos leucócitos maternos. Anticorpos monoclonais exemplares estão descritos nas referências seguintes.

Herzenberg et al., PNAS, 76:1453 (1979) descreve o isolamento de células de fetos, aparentemente de origem linfóide, de san-



— gue materno, por meio de passagem de células activadas de fluorescência (FACS) em que a separação se baseou na detecção de amostras de anticorpos marcadas que se ligam células de HLA-A2 negativo no sangue materno. As células de fetos machos separadas dessa maneira foram ainda identificadas por manchamento com quinacrina de 1-cromatina.

Covone et al., Lancet, 13 de Outubro, 1984:841 descreveu a recuperação de trofoblastos de fetos a partir do sangue materno por citometria de passagem usando um anticorpo monoclonal denominado H315. O referido monoclonal identifica descritivamente uma glicoproteína expressa na superfície do sincitiotrofoblasto humano bem como outras populações de células trofoblastos, e que se encontra ausente das células periféricas do sangue.

Kawata et al., J. Exp. Med. 160:653 (1984) descreve um método para isolar as populações de células de placenta a partir de suspensões de placenta humana. O método coordena a análise e a passagem de FACS em duas cores e de dispersão de luz. Isolaram-se cinco populações de células diferentes com base nas diferenças de tamanho e quantitativas na expressão coordenada de antígenos de células de superfície detectados por anticorpos monoclonais contra uma determinante monomórfica HLA-A, B e C (MB40.5) e contra trofoblastos humanos (anti-Trofo-1 e anti-Trop-2).

Loke e Butterworth, J. Cell. Sci, 76:189 (1985), descreve dois anticorpos monoclonais, 18B/AS e 18A/CA, que são reactivos com os citotrofoblastos do primeiro trimestre e outros tecidos de fetos epiteliais incluindo os sincitiotrofoblastos.

— Um anticorpo monoclonal preferido para separar as células de fetos do sangue materno para manchamento de acordo com a presente invenção é o anticorpo de anti-citoqueratina Cam 52, que

que pode ser comercialmente obtido de Becton-Dickireson (Franklin Lakes, N.J. USA).

Outros anticorpos monoclonais preferidos para a separação de células de fetos do sangue materno são os descritos no pedido de patente americano USSN 389224 apresentado em 3 de Agosto, 1989, com o título "Método para isolar Células de Citotrofoblasto de Fetos". /Veja-se também: em Fischer et al., J. Cell. Biol., 109, (2):891-902 (1989)7. Os anticorpos monoclonais aí descritos reagem especificamente com antígeno nas células de citotrofoblasto humano do primeiro trimestre, células de fetos essas que têm a maior possibilidade de atingir a circulação materna. O referido pedido de patente e o artigo são aqui especificamente incorporados por referência. Em resumo, os anticorpos monoclonais descritos foram levantados injectando os animais do teste com células de citotrofoblasto obtidas de troços de uma paciente que haviam sido isoladas por aspiração uterina. Os anticorpos levantados foram submetidos a várias selecções citológicas para serem seleccionados para os anticorpos que reagiam com a camada de células de corrente de citotrofoblasto dos vitelos coriônicos do primeiro trimestre.

Os anticorpos monoclonais preferidos contra as referidas células de citotrofoblasto do primeiro trimestre descritos por Fischr et al., incluem anticorpos monoclonais produzidos dos hibridomas seguintes, depositados na American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) de acordo com o tratado de Budapeste:

Hibridoma	Acesso ATCC #
J1D8	HB10096
P1B5	HB10097

Ambas as culturas de hibridoma foram recebidas pelo ATCC em 4

de Abril de 1989 e descritas como tal viáveis em 14 de Abril, 1989.

Fisher et al., estabelece que as células de fetos isoladas do sangue materno por meio do uso dos referidos anticorpos monoclonais são capazes de réplica in vitro. Deste modo, as células de feto isoladas pelo método de Fisher et al., quer dizer, os citotrofoblastos de fetos do primeiro trimestre, podem proporcionar material cromossômico de feto que esteja em metáfase e em interfase.

As células de feto, de preferência os leucócitos e os citotrofoblastos, mais preferencialmente os citotrofoblastos, uma vez marcados com um anticorpo apropriado são depois separadas das células maternas ou directamente ou, de preferência, separando e concentrando as referidas células de fetos por meio de distribuição e separação das células. Por exemplo, pode ser usado FACS para separar células de feto fluorescentemente marcadas, ou pode ser usada citometria de passagem.

As células de feto uma vez separadas do sangue materno podem então ser manchadas de acordo com os métodos da presente invenção com reagentes de coloração de cromossomas específicos apropriados da presente invenção, de preferência os de particular importância para o diagnóstico pré-natal. Os reagentes de coloração preferidos são os designados para detectar aneuploidia, por exemplo, trisomia de quaisquer dos vários cromossomas, incluindo os tipos de cromossomas 21, 18, 13, X e Y e as subregiões desses cromossomas, tais como a sub-região 21q22 no cromossoma 21.

De preferência, uma amostra de feto para a análise de mancha-mento de acordo com a presente invenção compreende pelo menos 10 células ou núcleos, e mais preferivelmente cerca de 100 células ou núcleos.

VII.D Citogenético de Tumor

Numerosos estudos nos anos recentes têm revelado a existência de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas que são diagnóstico para fenótipos de doenças particulares e que proporcionam uma indicação para a natureza genética de própria doença. Os exemplos proeminentes incluem a estreita associação entre a leucemia mielogénica crónica e a translocação que envolve os cromossomas 9 e 22, a associação de uma anulação de um troço de 13q14 com retinoblastoma e a associação de uma translocação que envolve os cromossomas 8 e 14 com o linfoma de Burkitts. O actual progresso na elucidação de novas anormalidades específicas de tumores é limitada pela dificuldade de produzir sequências de metafase em bandas, representativas de elevada qualidade para a análise citogenética. Estes problemas advêm do facto de que muitos tumores humanos são difíceis ou impossíveis de crescer em culturas. Deste modo, a obtenção de células mitóticas é usualmente difícil. Mesmo se as células puderem crescer em culturas existe o risco significativo de que as células que crescem possam não ser representativas da população tumorigénica. Essa dificuldade impede também a aplicação do conhecimento genético existente para o diagnóstico e prognóstico clínico.

A presente invenção ultrapassa estas limitações permitindo a detecção de aberrações estruturais e numéricas específicas nos núcleos de interfase. Estas aberrações são detectadas tal como se descreveu acima. A hibridização com amostras de cromossomas inteiros facilitará a identificação de aberrações previamente desconhecidas, permitindo desse modo o referido desenvolvimento de novas associações entre fenótipos de aberrações e doenças. Uma vez que a natureza genética das doenças malignas específicas se torna cada vez mais bem conhecida, os ensaios de interfase podem ser tornados cada vez mais específicos selec-

cionando amostras de hibridização dirigidas à lesão genética. As translocações em sítios específicos nos cromossomas seleccionados podem ser detectadas usando amostras de hibridização, que flanqueiam de forma estreita os pontos de interrupção. O uso destas amostras permite o diagnóstico destes fenótipos de doenças específicas. As translocações podem ser detectadas em interfase uma vez que elas juntam os domínios de hibridização que estão normalmente separados, ou uma vez que separam um domínio de hibridização em dois domínios bem separados. Adicionalmente, podem ser usados para seguir a redução e a re-emergência das células malignas durante o decurso de terapia. A análise de interfase é particularmente importante numa aplicação dessas dado o pequeno número de células que podem estar presentes e uma vez que elas podem ser difíceis ou impossíveis de serem estimuladas em mitose.

As duplicações e anulações, os processos envolvidos na amplificação de genes e a perda de heterozigosidade podem também ser detectadas em sequências de metafase e núcleos de interfase usando as técnicas da presente invenção. Os referidos processos estão implicados num número crescente de tumores diferentes.

VIII. Detecção de Fusão BCR-ABL na Leucemia Mielogénica Crónica (CML)

Amostras. Esta secção descreve em pormenor um ensaio de CML com base em FISH com amostras dos cromossomas 9 e 22 que flanqueiam as sequências de BCR e ABL fundidas essencialmente em todos os casos de CML (Figura 8). As amostras de BCR e ABL usadas nos exemplos da presente invenção foram amavelmente fornecidas por Carol A. Westbrook do Departamento de Medicina, Secção de Hematologia/Oncologia de Universidade de Chicago Medical

Center em Chicago Illinois (USA).

A amostra de ABL no cromossoma 9, c-hu-ABL, é um clone de cosmídeo 35-kb (pCV105) seleccionado como sendo telomérico para a região 200-kb do ABL entre os exões IB e II em que ocorrem as interrupções (24). A amostra de BCR no cromossoma 22, PEM12, é um clone de fage 18-kb (em EMBL3) que contém parte de - e se estende centromérico para - a região do grupo do ponto de interrupção 5,8-kb do gene BCR em quase todos os pontos em que ocorrem pontos de interrupção de CML. Foi levada a cabo FISH usando uma amostra de ABL marcada com biotina, detectada com o vermelho de fluorocromo do Texas e uma amostra de BCR marcada com digoxigemina detectada com o FITC de fluorocromo verde. A hibridização de ambas as amostras podia ser observada simultaneamente usando um microscópio de fluorescência equipado com um conjunto de filtro de passagem de banda dupla (Omega Optical).

A Figura 8 é uma representação esquemática do gene BCR no cromossoma 22, o gene ABL do cromossoma 9 e o gene da fusão de BCR-ABL no cromossoma de Filadelfia, que mostra a localização das regiões de interrupção de CML e a sua relação com as amostras. Os exons do gene BCR estão representados sob a forma de caixas sólidas. O número romano I refere-se ao primeiro exão do gene BCR; os números 1-5 referem-se aos exões dentro da região do grupo dos pontos de interrupção, indicada aqui pela risca. A localização aproximada da amostra PEM12 de fage 18 kb (a amostra BCR) está indicada pela barra horizontal aberta. Uma vez que a maior parte das regiões de interrupção de CML ocorrem entre os exões 2 e 4, permanecerão no cromossoma de Filadelfia 15 kb ou mais do sinal para o PEM 12. Na translocação recíproca clássica encontrar-se-ão no cromossoma derivado alguns kb de sinal para o PEM 12 (sinal fluorescente não detectável). A numeração do mapa e o exão (não à escala) é adaptada

de Heisterkamp et al., (ref. 34, acima). Os exões do gene ABL estão representados como barras verticais abertas (não à escala). Os números romanos Ia e Ib referem-se aos primeiros exões alternativos e o II ao segundo exão. O exão II é aproximadamente 25 kb a montante da terminação do cosmídio 28 kb c-hu-abl (a amostra ABL). Todos os pontos de interrupção de CML ocorrem a montante do exão II, usualmente entre os exões Ib e Ia, dentro de uma região que é aproximadamente 200 kb de comprimento. Assim, o c-hu-abl estará sempre a uma distância de 25 a 200 kb da junção de fusão. O mapa (não à escala) é adaptado de Heisterkamp et al. (ref. 35, acima). O gene da fusão BCR-ABL está representado na CML, o PBM12 situar-se-à sempre na junção e o c-hu-abl estará separado do PBM12 por 25 a 225 kb.

Preparação de amostra: CML-4: centrifugou-se sangue periférico durante 5 minutos. Diluíram-se dez gotas de interfase com PBS, agitou-se, fixou-se em metanol/ácido acético (3:1) e gotejou-se sobre películas CML-2, 3, 7: fixaram-se cinco a 10 gotas de medula, diluída com PBS para impedir a clotação, em metanol/ácido acético e gotejaram-se sobre películas CML-1, 4, 5, 6: cultivou-se sangue periférico e/ou medula de osso em RPMI 1640 aumentado com soro de feto de vitelo, uma mistura antibiótica (gentamicina 500 mg/ml) e 1 % de L-glutamina, durante 24 horas. As culturas foram sincronizadas de acordo com J. J. Yunis e M. E. Chandler Prog. in Clin. Path., 7:267 (1977) e as preparações de cromossomas seguiam Gibis e Jackson, Karyogram, 11:91 (1985).

Hibridização e Protocolo de Detecção: A hibridização seguiu processos descritos por D. Pinkel et al. (27), Trask et al., (25), e J. B. Lawrence et al., (30), com modificações. A amostra de BCR foi traduzida em partes (Bethesda Research Laboratories Nick-Translation System) com digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim Biochemicals) com uma incorporação média de

25 %. A amostra de ABL foi de igual modo traduzida em partes com biotina-11-dUTP (Enzo Diagnostics).

1. Hibridização. Desnaturam-se células de interfase e/ou sequências de metafase em películas de vidro a 72°C em 70 % de formamida/2 x SSC a um pH de 7, durante 2 minutos. Desidratam-se em séries de etanol (70 %, 85 % e 100 % de cada vez, durante 2 minutos). Secam-se ao ar e colocam-se a 37°C (2 x SSC) e o NaCl 0,3 M/citrato de sódio 30 mM). Aquecem-se 10 ml da mistura de hibridização contendo 2 ng/ml de cada amostra, 50 % de formamida / 2 x SSC, 10 % de sulfato de dextrano e 1 mg/ml de ADN genómico humano (tratado com ultra-sons para 200-600 bp) a 70°C, durante 5 minutos para desnaturar o ADN. Incubam-se durante 30 minutos a 37°C. Colocam-se em películas aquecidas cobrem-se com uma cobertura de 20 mm x 20 mm, selam-se com cola de borracha e incubam-se durante a noite numa câmara com humidade a 37°C. Removem-se as coberturas e lavam-se três vezes durante 20 minutos de cada vez em 50 % de formamida/2 x SSC pH 7 a 42°C, duas vezes durante 20 minutos cada vez em 2 x SSC a 42°C e finalmente enxaguam-se à temperatura ambiente em 4 x SSC.

2. Deteção de amostras ligadas: todas as fases de incubação são levadas a cabo com aproximadamente 100 ml de uma solução à temperatura ambiente sob coberturas. A amostra de ABL biotinilada foi detectada primeiro em seguida a amostra de BCR marcada com digoxigenina.

a. Amostra de ABL biotinilada: Pré-bloqueia-se com 4 x SSC/1% de albumina de soro de bovino (BSA) durante 5 minutos. Aplica-se avidina-vermelha do Texas (Vector Laboratories Inc., 2 mg/ml em 4 x SSC / 1 % BSA) durante 45 minutos. Lava-se em 4 x SSC uma vez, 4 x SSC/1 % Triton-X 100 (Sigma) e depois novamente em 4 x SSC, 5 minutos de cada vez. Pré-bloqueia-se durante

5 minutos em PNM (PN contendo 5 % de leite seco magro e 0,02 % de azida de sódio e centrifuga-se para remover os sólidos. PN é NaH_2PO_4 0,1M/ Na_2HPO_4 0,1M, 0,05% de NP40, pH 8). Aplica-se anti-avidina de cabra biotinilada (Vector Laboratories Inc., 5 mg/ml em PNM) durante 45 minutos. Lava-se duas vezes em PN durante 5 minutos. Aplica-se uma segunda camada de avidina-vermelha do Texas (2 mg/ml em PNM) durante 45 minutos. Lava-se duas vezes em PN durante 5 minutos de cada vez.

b. Amostra de BCR marcada com Digoxigenina: Pré-bloqueia-se com PNM durante 5 minutos. Aplica-se anti-corpo de anti-digoxigenina de carneiro (obtido de D. Pepper, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; 15,4 mg/ml em PNM) durante 45 minutos. Lava-se duas vezes em PN durante 5 minutos de cada vez. Pré-bloqueia-se com PNM durante 5 minutos. Aplica-se anti-corpo de coelho-anti-carneiro conjugado com FITC (Organon Teknika-Cappel, 1:50 em PNM) durante 45 minutos. Lava-se duas vezes, durante 5 minutos de cada vez em PN. Se for necessário amplifica-se o sinal por meio de pré-bloqueamento durante 5 minutos com PNM e aplica-se anticorpo IgG de carneiro-anti-coelho conjugado para FITC (Organon Teknika-Cappel, 1:50 em PNM) durante 45 minutos. Enxagua-se em PN.

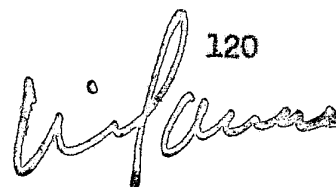
3. Visualização: montam-se as películas numa solução anti-desvanecimento fluorescente [G. D. Johnson e J. G. Nogeria, J. Immunol. Methods, 43:349 (1981)) (ref. 31, acima)] contendo 1 mg/ml de 4',6-amidina-2-fenilindol (DAPI) como contramancha e examina-se usando um conjunto FITC/filtro Texas de passagem de banda dupla vermelho, (Omega Optical) num Zeiss Axioskosp.

O método usado para o PCR BCR-ABL aqui testado foi o descrito em Hegewisch-Bectet et al., para a CML-3,4 e 7 (ref.32, acima) e Kohler et al., para a CML-5 e 6 (ref. 33, acima).

W. F. A. A.

Resultados. Os locais de hibridização ABL e BCR eram visíveis em ambos os cromatídeos dos cromossomas na maior parte das sequências de metafase. A amostra de ABL ligou-se às sequências de metafase de indivíduos normais (Figuras 9A) próximo do telômero em 9q, enquanto que a amostra BCR se ligou em 22q11 (Figura 9B). A hibridização com a amostra de ABL ou BCR para os núcleos de interfase normais resultaram tipicamente em dois pequenos pontos fluorescentes correspondentes à sequência pretendida em ambos os homólogos de cromossomas. Os pontos estavam aparentemente distribuídos ao acaso nas duas imagens dimensionais nucleares e estavam usualmente bem separadas. Algumas células mostravam dois sinais em duplete de hibridização, provavelmente um resultado da hibridização para ambos os cromatídeos irmãos de ambos os homólogos nas células que tinham duplicado esta região de ADN (isto é, aquelas que estavam na fase S ou na fase G2 do ciclo da célula). O FISH de cor dupla da amostra ABL (vermelho) e BCR (verde) para os núcleos G1 normais originou dois sinais de hibridização vermelhos (ABL) e dois sinais de hibridização (verdes (BCR), distribuídos ao acaso à volta do núcleo.

O rearranjo genético da CML torna as sequências de ADN homólogas às amostras conjuntamente num cromossoma anormal, usualmente o Rh^1 , e juntamente no núcleo de interfase, tal como se ilustra na Figura 8. A distância genómica entre os sítios de ligação da amostra no gene de fusão varia entre os casos de CML, variando entre 25 e 225 kb, mas permanece a mesma em todas as células de um único clone leucémico. A hibridização de cor dupla com amostras de ABL e BCR para as células CML de interfase resultaram num sinal de hibridização vermelho e num sinal de hibridização verde, localizados ao acaso no núcleo e num sinal duplo vermelho-verde em que a separação entre as duas cores era inferior a 1 micra (ou um sinal de hibridização amarelo para a hibridização numa proximidade muito pequena,



veja Figura 10). Os sinais vermelho e verde localizados ao acaso são atribuídos à hibridização aos genes ABL e BCR nos cromossomas normais e o sinal duplo vermelho verde à hibridização para o gene de fusão BCR-ABL. Os estudos de marcação da interfase sugerem que as sequências de ADN separadas em menos do que 250 kb deveriam ser separadas nos núcleos da interfase em menos do que 1 micron (25). Como resultado, as células que mostram sinais de hibridização vermelho e verde separadas acima de 1 micron foram seleccionadas como normais uma vez que este valor é consistente com os sítios de hibridização que se encontram em cromossomas diferentes. Contudo, devido a considerações estatísticas, algumas células normais terão pontos vermelhos e verde suficientemente próximos para serem seleccionados como anormais. Nestas duas análises dimensionais nucleares 9 de 750 núcleos normais tinham sinais de hibridização vermelho inferiores a 1 micron de cada um. Deste modo, aproximadamente 1 % das células normais foram classificadas como anormais.

A Tabela 3 mostra os resultados da hibridização para 7 amostras de 6 casos de CML juntamente com cariotipos convencionais e outros resultados de diagnóstico, (dados da mancha de PCR e de Southern). Todos os seis casos incluindo 3 que se descobriu como sendo Ph^1 negativo por meio da análise de bandas (CML-5, -6 e -7), mostraram sinais de hibridização vermelho-verde separados menos do que 1 micron em mais de 50 % dos núcleos examinados. Na maior parte deles, o acontecimento de fusão era visível em quase todas as células. Um caso (CML-7) mostrou sinais de fusão em quase todas as células mas mesmo assim a análise PCR falhou em detectar a presença de um gene de fusão e a análise de bandas não revelou um cromossoma de Filadelfia.

T a b e l a 3

Sumário da hibridização citogenética de fluorescência e outras análises de rearranjo

BCR-ABL em 6 casos de CML

Hibridização de fluorescência in situ

Metáfase

CML-1^a 46XX,t(9;22)(q34;q11) Hibridização para telômero de pequeno acrocêntrico

CML-2^d 46XY,t(9;22)(q34;q11) não disponível

CML-3^{d,e} 46XY,t(9;22)(q34;q11) Não disponível

CML-4^{d,e} 46XY,t(9;22)(q34;q11) Não disponível

CML-5^c 47XY,+8,de(22)(q11) 47 cromossomas. Fusão vermelha-verde num telômero de pequeno acrocêntrico

CML-6^a 46XYins(22;9)q11;q34;q? Fusão intersticial vermelho-verde de pequeno acrocêntrico

CML-7^b 46XYt(5;9)q(?;q?) Não disponível

Wifama

122
Wifama

T a b e l a 3 - continuação

Sumário da hibridização citogenética de fluorescência e outras análises de rearranjo

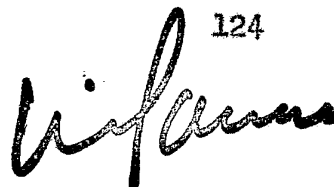
BCR-ABL em 6 casos de CML

<u>Amostra</u>	<u>Núcleos de interfase</u>	<u>outra informação</u>
CML-1 ^a	80 % revelou fusão vermelho-verde 2 % revelou ábules vermelho-verde 18 % não interpretável	
CML-2 ^d	60 % revelou fusão vermelho-verde a eficácia de hibridização foi baixa	fusão BCR-ABL positiva por PCR
CML-3 ^{d,e}	75 % revelou fusão vermelho-verde 25 % pareceram normais	fusão BCR-ABL positiva por PCR
CML-4 ^{d,e}	100 % revelou fusão vermelho-verde	fusão BCR-ABL positiva por PCR
CML-5 ^e	100 % revelou fusão vermelho-verde	fusão BCR-ABL positiva por PCR
CML-6 ^a	100% revelou fusão vermelho-verde	fusão BCR-ABL positiva por PCR
CML-7 ^b	100 % revelou fusão vermelho-verde	Rearranjo de BCR detec- tado por análise de Sourthern



Dados clínicos: a) CML em fases crónica de não recebendo tratamento; b) CML, fase crónica recebendo hidroxiureia; c) CML, crise forte não recebendo tratamento; d) CML crise forte recebendo hidroxi-ureia; e e) CML-3 e CML-4 representam respectivamente amostras de medula de osso e de sangue de um paciente.

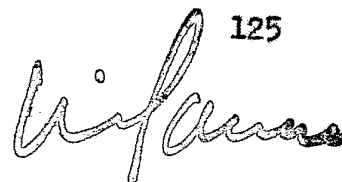
A hibridização para sequências de metabase foi levada a cabo em três casos (CML-1, -5 e -6). Todos estes casos revelaram sinais de hibridização vermelho e verde numa grande proximidade num único cromossoma acrocêntrico. Em dois casos, seleccionados como t(q:22)(q34;q11) por bandas, o par vermelho-verde estava numa grande proximidade em relação ao telómero do braço comprido de um pequeno cromossoma acrocêntrico tal como se esperava para o Ph¹ (Figura 9C). Suspeitava-se que um caso, (CML-6), por citogenia clássica, tivesse uma inserção de material cromossómico no 22q11. A hibridização de cor dupla para sequência de metáfase a partir deste caso, revelaram que o par vermelho-verde estava centralmente localizado num pequeno cromossoma (Figura 9D). Esse resultado é consistente com a formação do gene de fusão BCR-ABL por uma inserção. Num caso (CML-1), dois pares de sinais dubletos vermelho-verde foram vistos em 3 dos 150 núcleos de interfase (2 %). Isso pode indicar um Ph¹ duplo (ou um gene de fusão duplo) nessas células. Um tal acontecimento não foi detectado pela citogenia estabelecida que se limitava à análise de 25 sequências de metáfase. A aquisição de um Ph¹ adicional é o acontecimento citogenético mais frequente que acompanha a transformação forte e a sua detecção citogenética pode ser um sinal precursor da aceleração da doença.



A hibridização simultânea com amostras de ABL e BCR para sequências de metáfase da linha de células K-562 revelou múltiplos sítios da hibridização vermelho-verde ao longo de ambos os braços de um único cromossoma acrocêntrico. A hibridização para núcleos de interfase mostrou que os sinais vermelho e verde estavam confinados à mesma região do núcleo. Esse facto é consistente com a sua situação de estarem localizados num único cromossoma. Foram vistos doze a quinze pares de hibridização em cada núcleo indicando a amplificação correspondente do gene de fusão BCR-ABL (veja-se Figuras 9E e 9F). Estas descobertas são consideradas com os dados da mancha de Southern anteriores que mostraram a amplificação do gene de fusão nesta linha de células (26).

Em resumo, a análise de células de interfase para sete CML, e quatro amostras de células normais usando o FISH de cor dupla com amostras de ABL e BCR sugere a utilidade desta aproximação para o diagnóstico de rotina da CML e do controlo clínico da doença. De entre as suas importantes vantagens estão a capacidade de obtenção de informação genética de células individuais de interfase ou metáfase em menos de 24 horas. Deste modo pode ser aplicado a todas as células de uma população, não apenas aquelas que acontecia estarem em metáfase quer por acaso quer ainda através de cultura. Além disso, a análise genotípica pode ser associada com o fenotipo da célula, tal como se julga pela morfologia ou outras formas de marcas, permitindo deste modo, o estudo de especificidade de espécie das células que transportam o genotipo de CML, bem como a verificação da frequência das células que transportam a anormalidade.

A justaposição ao acaso de sinais vermelhos e verdes em duas imagens dimensionais de células normais, que ocorre em cerca de 0,01 células normais, estabelece a baixa frequência do limite de detecção. Esse limite de detecção pode ser diminuído

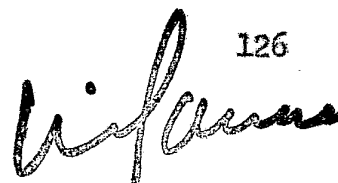


por uma medição quantitativa mais completa da separação e intensidade dos sinais de hibridização em cada núcleo usando a análise de imagem computadorizada. A referida análise será particularmente importante no estudo de população de pacientes em que as células transportam a fusão de BCR-ABL a baixa frequência (por exemplo, durante o remissão, depois de um transplante da medula de osso, durante numa recaída ou em sistemas modelo).

Este ensaio poderá também ser vantajoso para a detecção de células de CML durante a terapia, quando o número de células disponível para análise é baixo, uma vez que são apenas necessárias algumas células. Finalmente, a contagem simples dos pontos de hibridização permite a detecção e a análise quantitativa de amplificação do gene de fusão BCR-ABL tal como se ilustra para a linha de células K562 (Figura 9E). A medição quantitativa de intensidade de fluorescência pode auxiliar com a referida análise.

IX. Método de Preparação e Aplicação de Amostras de Ácido Nucleico de Cadeia Simples a ADNs de Cadeia Dupla pretendidos

Em geral, o método para a preparação e aplicação de amostras de hibridização de ADN de cadeia simples a ADN de cadeia dupla pretendido envolve o tratamento do ADN pretendido e do ADN de amostra com a mesma endonuclease de restrição seguido da digestão de cadeias simples adjacentes aos cortes de restrição. As amostras são constituídas ressintetizando as cadeias simples com nucleótidos marcados. As cadeias marcadas são substancialmente complementares às cadeias simples não digeridas dos ADNs pretendidos. Os fragmentos de ADN de cadeia dupla contendo as cadeias simples marcadas são partidos em troços mais



pequenos e desnaturados. As amostras de hibridização são obtidas separando os fragmentos de cadeia simples marcados dos fragmentos não marcados.

O ADN a ser usado nas amostras é tratado com uma endonuclease de restrição para formar fragmentos de restrição com extremidades em forma de tenaz "sticky". Quer dizer, é importante que a endonuclease de restrição faça um corte agudo através o ADN de cadeia dupla. A endonuclease de restrição apropriada inclui, mas não se limita a Hind III, Bam HI, Eco RI ou semelhante, todos os quais se encontram à disposição no comércio, por exemplo, Promega Biotec (Madison, WI), ou Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Ao seleccionar uma endonuclease de restrição é preferível que os fragmentos de restrição resultantes se encontrem dentro de um tamanho que permita que os mesmos se insiram directamente nos vectores de clonação disponíveis. Os vectores de clonação apropriados incluem os plasmídios, tais como pBR322, e as fages, tais como a fage de lambda em que vários derivados destes se encontram à disposição no comércio, por exemplo, Promega Biotec (Madison, WI), e Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Isolam-se cópias amplificadas dos fragmentos de restrição usando técnicas conhecidas, por exemplo, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Alternativamente, para algumas aplicações, podem ser obtidos fragmentos de restrição das bibliotecas existentes. Por exemplo, a American Type Culture Collection, Rockville, MD, tem colecções de bibliotecas de cromossomas humanos específicos de fragmentos de restrição que se encontram à disposição do público.

São seguidos processos conhecidos no tratamento dos fragmentos de restrição com exonuclease e na re-sintetização por via enzimática das cadeias digeridas na presença de precursores marcados. Segue-se, em particular, a técnica descrita por James

e Saffax, Anal. Biochem. Vol. 141, pag. 33-37 (1984). Deste modo, esta referência é aqui incorporado como referência. Em resumo, aos fragmentos de restrição adicionam-se cerca de 3 unidades de exonuclease III por micrograma de ADN numa solução consistindo em NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 10mM, e ditiotritol 1mM, a 37°C. Termina-se a digestão aquecendo a amostra a 60°C durante 5-10 minutos. James e Saffax K referem que estas condições resultam na digestão de cerca de 80-200 nucleótidos por minuto. A taxa de digestão de facto varia dependendo da fonte e do conjunto de exonuclease III, bem como da fonte do substrato de ADN, por exemplo, Guo et al., Nucl. Acids. Res., Vol. 10, pag. 2065. Pode ser necessária alguma experimentação para se obterem cadeias marcadas com o comprimento desejado. A exonuclease III encontra-se à disposição no comércio, por exemplo, Boehringer (Indianapolis, IN), ou Promega Biotec (Madison, WI). Também a polimerase T4 (BRL, Bethesda, MD) pode ser usada para as fases de exonuclease e re-síntese.

Os fragmentos de restrição tratados com exonuclease servem como modelos primários para uma polimerase de ADN que re-sintetiza as cadeias digeridas na presença de precursores marcados. O precursor marcado preferido é o uracil biotinilado, como substituto para timidina. A re-síntese é levada a cabo usando polimerase I de ADN ou polimerase de ADN T4, seguindo o processo de Langer et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., Vol. 78, pag. 6633-6637 (1981) que, por sua vez, é uma adaptação da técnica de tradução básica, descrita por Rigby et al., J. Mol. Biol., Vol. 113, pag. 237 (1977), por exemplo, 1 unidade E. Coli do polimerase I por micrograma de ADN é incubado a 37°C numa solução consistindo em NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 10 mM, ditiotritol 1mM e KCl 50 mM. Incluem-se igualmente na solução quantidades apropriadas dos precursores de trifosfato (dos quais são marcados um deles ou mais), por exemplo, 50-100

— micromolares de cada para 20-50 microgramas por mililitro de fragmentos de restrição. Nestas condições, a re-síntese completa-se num espaço de cerca de 40-60 minutos.

Os fragmentos de restrição marcados são partidos em fragmentos mais pequenos para assegurar que as regiões marcadas em ambas as extremidades dos fragmentos de restrição marcados fiquem separados. (De outro modo, o fragmento marcado numa extremidade seria uma parte de um troço maior do ADN de cadeia única que continha regiões complementares para o fragmento marcado na outra extremidade). A referida fragmentação em fragmentos mais pequenos é levada a cabo por meio de qualquer uma das técnicas conhecidas, por exemplo, por tratamento com sons (sonicação), tratamento enzimático, ou semelhante, Maniatis, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

Depois de os fragmentos de restrição marcados terem sido apropriadamente partidos em troços mais pequenos, são desnaturados e os fragmentos marcados de cadeia única são separados dos fragmentos não marcados. A separação pode ser levada a cabo de várias maneiras. Sempre que se usa a marca preferida - a biotina - o meio de separação preferido é por meio de uma coluna de afinidade de avidina conhecida, por exemplo, Bayer e Wilchek, "The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology", Methods of Biochemical Analysis, Vol. 26, pag. 1-45 (1980); e Manning et al., Biochemistry, Vol. 16, pag. 1364-1370 (1977). A avidina pode ser covalentemente acoplada a vários substratos diferentes, tais como vidro, Seforose, agarose, e semelhante, com técnicas conhecidas, tal como descritas nas referências acima. Deste modo, Manning et al., e Bayer e Wilchek, pag. 9-16 são aqui incorporados como referência. As colunas de afinidade de avidina podem também ser obtidas no comércio, por exemplo, Zymed Laboratories, Suc. (South San Fran-

cisco, CA). As amostras biotiniladas são removidas da coluna de avidina seguindo o processo de Chollet e Kawashina, Nucleic Acids Resources, Vol. 5, pag. 1529-1541 (1985).

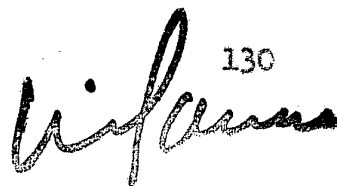
Existem alternativas ao processo acima descrito. Por exemplo depois de o ADN a ser usado nas amostras ser tratado com uma endonuclease de restrição, os fragmentos de restrição resultantes são separados em duas porções. A primeira porção é submetida a tratamento tal como se descreveu acima. Quer dizer, é tratado com exonuclease para formar modelos primários para a re-sintetização de uma cadeia de ADN marcada. Os fragmentos de restrição re-sintetizados resultantes são depois separados em troços mais pequenos, tal como se descreveu acima. A marca neste caso, não necessita de ser biotina. Por exemplo, pode ser usada uma marca radioactiva. A segunda porção é também tratada com uma exonuclease, de preferência exonuclease III. Contudo, deixa-se proceder a reacção até estar completa a fim de que cada fragmento de restrição se converta em dois troços de cadeia única não complementares aproximadamente metade do comprimento de cadeia mestra. Estas cadeias únicas resultantes são depois covalentemente ligadas a papel DBM usando técnicas conhecidas, por exemplo, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982), pag. .. 335-339; e Alwine et al., Methods in Enzymology. Vol. 68, pag. 220-242 (Academic Press, New York, 1979). Deste modo, as páginas citadas destas referências são aqui incorporadas por referência. Os fragmentos da primeira porção são desnaturados e combinados com papel DBM contendo os fragmentos covalentemente ligados da segunda porção. As condições são ajustadas para permitir a hibridização das cadeias marcadas para cadeias complementares covalentemente marcadas para o papel DBM. As cadeias não marcadas da primeira porção são levadas a partir do papel (não havendo quaisquer cadeias complementares para hibridizarem com elas). Depois de se lavarem as cadeias marcadas são re-

movidas por aquecimento, por exemplo, ficando prontas a serem usadas.

Antes da aplicação da amostra ao ADN pretendido, o ADN pretendido é tratado com a mesma endonuclease de restrição tal como na construção da amostra. Depois do tratamento de endonuclease de restrição o ADN pretendido é tratado com uma exonuclease, de preferência exonuclease III ou polimerase T4. De preferência, as condições do tratamento de exonuclease são ajustadas de modo a que os comprimentos das regiões de cadeia única criadas, sejam substancialmente iguais aos comprimentos do ADN da amostra.

A hibridização da amostra para o ADN pretendido é levado a cabo usando processos conhecidos, por exemplo, Gall e Pardue, Methods in Enzimology, Vol. 21, pag. 270-480 (1981); Henderson, International Review of Cytology, Vol. 76, pag. 1-46 (1982); e Angerer et al., in Genetic Engineering: Principles and Methods, Setlow e Hollaender, Eds. Vol. 7, pag. 43-65 (Plenum Press, New York, 1985). Deste modo, estas referências são incorporadas por referência como guias para o uso da invenção na hibridização in situ. Em resumo a amostra preparada de acordo com a invenção, é combinada com vários outros agentes para reduzir a ligação não-específica, para manter a integridade da estrutura biológica a ser testada e semelhante. A mistura resultante é aqui referida como mistura de hibridização. Abaixo, o método é aplicado na coloração específica de cromossomas do cromossoma 21 humano.

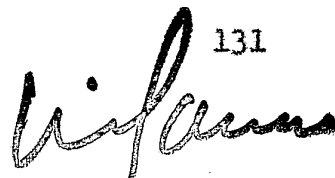
Os fragmentos de restrição Hind III do cromossoma 21 humano estão à disposição no National Laboratory Gene Library Project, através de American Type Culture Collection, Rockville, MD, Van Dilla et al., "Human Chromosome-Specific DNA Library: Construction and Availability; Biotechnology, Vol. 4, pag. 537-552



(1986). Alternativamente, esses fragmentos podem ser produzidos seguindo as descrições in Van Dilla et al., acima citado, ou Fuscoe et al., "Construction of Fifteen Human Chromosome-Specific DNA Libraries from Flow-Purified Chromosomes", Cytogenet Cell Genet., 43:79-86 (1986).

Os clones de uma biblioteca com insertos de sequência única são isolados pelo método de Benton e Davis. Science, Vol. 196 pag. 180-182 (1977). Em resumo, isolam-se cerca de 1000 fages recombinantes ao acaso da biblioteca específica do cromossoma 21. Transferem-se estas para nitrocelulose e ensaiam-se com ADN genómico humano total, traduzido.

Dos clones que não revelam uma forte hibridização, retiram-se aproximadamente 300 que contêm ADN aparente de sequência única. Depois de se amplificarem os clones seleccionados, a inserção do cromossoma h1 em cada clone é marcado com 32_p e hibridizado para manchas de Southern de ADN genómico humano digerido com a mesma enzima usada para construir a biblioteca do cromossoma 21, isto é, a Hind III. Os clones contendo uma sequência única são reconhecidos como sendo aqueles que produzem uma banda única durante a análise de Southern. Grosseiramente, seleccionam-se 100 desses clones para a mistura heterogênea de ADN de amostra. Os clones de sequência única são amplificados, as inserções são removidas por meio de digestão de Hind III, e as inserções são separadas dos braços de fage por meio de electroforese de gel. Os fragmentos do ADN de amostra (isto é, as inserções de sequência única) são removidas do gel e tratadas com exonuclease III tal como se descreveu acima, seguido pela re-síntese na presença do precursor UTP biotinilado. Os fragmentos de cadeia dupla resultantes são tratados com ultra-sons a fim de que em média cada fragmento revele cerca de 1,5-2,0 interrupções. Os pedaços resultantes são desnaturados e os fragmentos biotinilados são isolados por meio de cromatografia de



de afinidade de avidina tal como se descreveu acima.

Os cromossomas de linfócitos humanos são preparados seguindo Harper et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., Vol. 78, pag. 4458-4460 (1981). As células de metafase e interfase são lavadas 3 vezes em salina tamponada com fosfato, fixas em metanol:ácido acético (3 : 1) e gotejadas sobre películas de microscópio limpas. As películas são armazenadas numa atmosfera de azoto a -20°C .

As películas contendo células de interfase e/ou sequências de metafase são removidas do azoto, tratadas com RNase (100 microgramas/ml durante 1 hora a 37°C), tratadas durante cerca de 1-16 horas com Hind III a 37°C (10 unidade M 10 mM Tris-HCl, NaCl 50 mM, MgCl_2 10 mM e ditioenitritol 14 mM a pH 7,6), tratadas com exonuclease III tal como se descreveu acima e desidratadas em séries de etanol. Depois são tratadas com proteínas K (60 ng/ml a 37°C durante 7,5 minutos) e desidratadas. A concentração de proteinase K é ajustada dependendo do tipo de célula e do lote de enzima de modo a que não fique qualquer imagem microscópica de fase dos cromossomas na película seca. A mistura de hibridização consiste em (concentração finais) 2 x SSC (NaCl 0,15 M e nitrato de sódio 0,015 M), 10 por cento de sulfato de dextrano, 500 microgramas/ml de agente veicular ADN (ADN e espuma de arenque tratado com ultrassons) e 2,0 microgramas/ml de ADN de amostra marcado com biotina. Esta mistura é aplicada às películas numa densidade de 3 microlitros/ cm^2 sob uma cobertura de vidro e selado com cola de borracha. Depois de incubação durante a noite a 37°C , as películas são lavadas a 45°C (50 % de formamida-2xSSC pH7, 3 vezes 3 minutos seguido por 2 x SSC pH 7,5 vezes 2 minutos), e imersas em tampão BN (bicarbonato de Na 0,1 M, NP-40 0,05 por cento, pH8). Depois deste ponto não se voltam a deixar secar as películas.

As películas são removidas do tampão BN e bloqueadas durante 5

Wifama

— minutos à temperatura ambiente com tampão BN contendo 5 % de leite magro em pó (carnation) e 0,92 % de NaAzida (5 microlitros/cm², sob coberturas de plástico). Removem-se as coberturas e drena-se o líquido em excesso e aplica-se DCS de fluoresceína-avidina (3 microgramas/ml em tampão BN com 5 % de leite e 0,02 % de Na Azida), (5 microlitros/cm²). Substituem-se as mesmas coberturas e incubam-se as películas durante 20 minutos a 37°C. Em seguida, lavam-se as películas 3 vezes durante 2 minutos de cada vez em tampão BN a 45°C. A intensidade da fluorescência ligado com biotina é ampliada adicionando uma camada de anticorpo de antiavidina de cabra biotinilado (5 microgramas/ml em tampão BN com 5 % de soro de cabra e 0,02 % de Na Azida), seguido depois de lavagem acima referida, por outra camada de DCS de fluoresceína-avidina. O DCS de fluoresceína-avidina, a antiavidina de cabra e o soro de cabra encontram-se todos à disposição no comércio, por exemplo, Vector Laboratories (Burlingame, CA). Depois de se lavar em BN, adiciona-se antes da observação, uma solução antifade de fluorescência, p-fenilnonodiamina (1,5 microlitros/cm² de cobertura). É importante manter esta camada fina para se obter uma imagem microscópica ótima. Este reduz de forma significativa o desaparecimento da fluoresceína e permite a observação microscópica contínua até 5 minutos. As contramanchas de ADN (DAPI ou iodeto de propídio) estão incluídas no anti-desaparecimento a 0,25-0,5 microgramas/ml.

O iodeto de propídio de tinta de ADN específico de fluorescência vermelha (PI) é usado para permitir a observação simultânea de amostra hibridizada e do ADN total. A fluorescência e o PI são excitados a 450-490 nm, (combinação de filtro de Zeiss 487709). O aumento do comprimento de onda de excitação para 546 nm (combinação do filtro de Zeiss 487715) permite a observação do PI apenas. O DAPI, uma mancha específica de ADN fluorescente azul, excitado no ultravioleta (combinação do filtro



de Zeiss 487701) e usado como contramancha quando o ADN marcado com biotina e o ADN total são observados separadamente. Os cromossomas 21 de metafase são localizados por meio de pontos amarelos localizados ao acaso, distribuídos sobre o corpo do cromossoma.

As descrições das formas de realização anteriores da presente invenção foram apresentadas com o fim de ilustrar e descrever. Não pretendem ser exaustivas ou limitar a invenção à forma precisa descrita, podendo haver obviamente muitas modificações e variações, à luz dos ensinamentos. As formas de realização foram escolhidas e descritas a fim de melhor explicar os princípios de invenção e a sua aplicação prática permitindo deste modo que os peritos na matéria a utilizar de melhor forma em várias formas de realização e com várias modificações conforme seja apropriado para o uso contemplado em particular. Pretende-se que o âmbito da invenção seja definido pelas reivindicações em anexo.

Todas as referências aqui citadas são incorporadas nesta descrição por referência.



R E I V I N D I C A C Õ E S

1ª. - Processo para a preparação de amostras de ADN de cadeia única e sua aplicação para a coloração específica de cromossomas, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em

- a) se proporcionarem fragmentos de restrição com extremidade em zig-zague que consistem, cada uma, numa cadeia saliente e numa cadeia retraída;
- se tratarem os fragmentos de restrição com uma exonuclease para digerir uma parte da cadeia retraída e formar modelos primários;
- se tratarem os modelos/primários com uma ADN-polimerase de maneira que as cadeias únicas digeridas pela exonuclease sejam ressintetizadas na presença de um precursor de nucleósido trifosfato marcado para formar fragmentos ressintetizados;
- se cortarem os fragmentos ressintetizados em porções mais curtas de modo que as regiões marcadas em extremidade opostas de cada fragmento ressintetizado estejam em porções de ADN separados;
- se desnaturarem os fragmentos ressintetizados cortados;
- se separarem as cadeias marcadas dos fragmentos de ADN dos fragmentos ressintetizados cortados desnaturados, para formarem a amostra de ADN de cadeia única;
- se tratar o ADN a estudar de cadeia dupla com a mesma endonuclease de restrição usada para produzir os fragmentos de restrição;
- se tratar o ADN de cadeia dupla com uma exonuclease, depois do tratamento com a endonuclease de restrição;
- e



depois do tratamento com a exonuclease se aplicar a amostra de ADN de cadeia única ao ADN de duas cadeias a utilizar como alvo.

2ª. - Processo para a preparação de reagentes de coloração específica de cromossomas que proporcionam modelos de manchas indicativas de um ou vários rearranjos genéticos associados com a leucemia mielogénica crónica (CML), caracterizado pelo facto de se isolar o ADN específico dos cromossomas na vizinhança dos genes BCR e ABL;

se amplificarem troços do ADN específico dos cromossomas, que foi isolado;

se anular a capacidade de hibridização de e/ou se removerem as sequências repetitivas partilhadas contidas nos troços amplificados do ADN isolado, a fim de formar uma colecção de fragmentos de ácido nucleico, que se hibridizam predominantemente com o ADN cromossómico pretendido na vizinhança de um ou vários rearranjos genéticos suspeitos; e

se marcarem os fragmentos de ácido nucleico da colecção para formar uma mistura heterogénea de fragmentos de ácido nucleico.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de se realizar a citada operação de amplificação dos referidos troços de ADN isolado por clonação.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a mencionada operação de amplificação dos troços do ADN isolado ser efectuada mediante uma reacção da cadeia de polimerase (PCR).



5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a citada operação de remoção das sequências repetitivas partilhadas compreender a escolha dos troços amplificados do citado ADN isolado, os quais estão substancialmente isentos de sequências de ácido nucleico que são complementares do material cromossómico não assinalado.

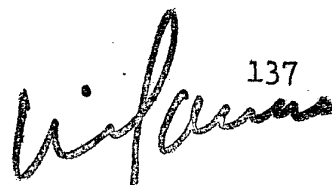
6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de a referida escolha dos mencionados troços amplificados compreender o uso da hibridização de Southern.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de a mencionada escolha dos referidos troços amplificados compreender clones de selecção para a presença de sequências repetitivas por hibridização com ADN genómico.

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de os citados clones serem clones do plasmídeo.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de a citada escolha dos referidos troços amplificados compreender a selecção dos referidos clones relativamente à hibridização com o material cromossómico assinalado e se remover os clones que não se hibridizam dessa maneira.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a citada operação de anulação da capacidade de hibridização compreender a hibridização dos referidos troços marcados do mencionado ADN isolado, com as sequências de ácido nucleico não marcadas.



11^a. - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de a referida operação de anulação da citada capacidade de hibridização compreender a adição de ácido nucleico de bloqueio não marcado à amostra do ácido nucleico marcado antes e/ou durante a hibridização com o material cromossómico assinalado como pretendido.

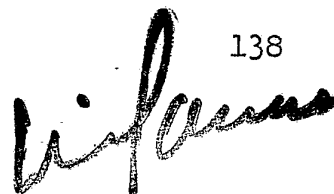
12^a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de o ADN de bloqueio não marcado ser genómico.

13^a. - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o ácido nucleico de bloqueio ser uma fracção de uma cópia elevada.

14^a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de ADN de bloqueio não marcado ser proveniente de uma selecção de clones contendo as sequências de cópia mais elevada de um genoma e/ou clones adicionais, conforme for necessário para se obter um contraste vantajoso.

15^a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a referida operação de anulação da citada capacidade de hibridização das sequências repetitivas partilhadas compreender a auto-reassociação da amostra de elevada complexidade.

16^a. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a citada operação de remoção das sequências repetitivas partilhadas compreender a aplicação de cromatografia em hidroxapatite.



17ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a referida operação de remoção das sequências repetitivas partilhadas compreender a remoção dos troços amplificados de ADN isolado, com sequências de ácido nucleico de cadeia única imobilizado, que são complementares das referidas sequências repetitivas partilhadas.

18ª. - Processo para a preparação de reagentes de manchar específico de cromossomas que compreendem uma mistura heterogênea de fragmentos de ácido nucleico marcados, caracterizado pelo facto de os fragmentos de ácido nucleico marcados serem complementares de sítios do material cromossómico assinalado, na proximidade de um ou vários rearranjos genéticos suspeitos associados com leucemia mielogénica crónica (CML) e serem substancialmente isentos de sequências de ácido nucleico que têm a capacidade de hibridização com os sítios do material cromossómico não assinalado.

19ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de os citados fragmentos de ácido nucleico marcados terem uma única cadeia.

20ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de os mencionados fragmentos de ácido nucleico serem marcados com reagentes detectáveis radioactivamente enzimaticamente imunorreactivamente, por meio de fluorocromos e/ou de afinidade.

21ª. - Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de os citados fragmentos serem biotinilados, modificados com N-acetoxi-N-2-acetilaminofluoreno, modificados com isotiocianato de fluoresceína, modificados com um ligando

de mercúrio/TNP, sulfonados, digoxigenenados ou conterem dímeros T-T.

22ª. - Processo para a preparação dum reagente de manchamento específico de cromossomas de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de ser específico para a fusão BCR-ABL característica de CML.

23ª. - Processo para a preparação dum reagente de manchamento específico de cromossomas, compreendendo uma mistura heterogénea de fragmentos de ácido nucleico de cadeia única marcados, caracterizado pelo facto de os referidos fragmentos de ácido nucleico marcados serem complementares em relação a sítios do material cromossómico assinalado e ser substancialmente isento de sequências de ácido nucleico tendo capacidade de hibridização com os sítios do material cromossómico não assinalado.

24ª. - Processo para a preparação dum reagente de manchamento específico dos cromossomas, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de os referidos fragmentos de ácido nucleico de cadeia única serem marcados com reagentes radioactivos, enzimáticos, imuno-reactivos e/ou detectáveis por afinidade.

25ª. - Processo para a preparação dum reagente de manchamento específico dos cromossomas, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de os citados fragmentos serem modificados com N-acetoxi-N-2-acetilamino-fluoreno, com ligando de mercúrio/TNP, sulfonado-digoxigenenados ou conterem dímeros T-T.

26ª. - Processo para a preparação dum reagente de manchamento

específico dum cromossoma, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em se isolar ADN específico do cromossoma; se amplificarem troços de ADN específico do cromossoma, isolado, utilizando a reacção de cadeia da polimerase (PCR); se anular a capacidade de hibridização de e/ou se remover as sequências repetitivas partilhadas contidas nos troços amplificados do ADN isolado a fim de se formar uma colecção de fragmentos de ácido nucleico, que se hibridizam predominantemente com o ADN cromossómico sinalizado; e

se marcarem os fragmentos de ácido nucleico da colecção para formar uma mistura heterogénea de fragmentos de ácido nucleico.

27ª. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleico que mancham de maneira segura e digna de confiança os citados materiais cromossómicos sinalizados, caracterizado pelo facto de os referidos materiais cromossómicos sinalizados estarem na vizinhança de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos que são associados ou com a leucemia miológica crónica (OML) ou com a leucemia linfocítica crónica (ALL).

28ª. - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo facto de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos servirem para o diagnóstico de OML.

29ª. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo facto de compreenderem sequências de ácido nucleico que são substancialmente homólogas das sequências de ácido nucleico em regiões cromossómicas que flanqueiam e/ou se prolongam parcial ou totalmente através de pontos de ruptura associados com doenças citogenicamente semelhantes mas geneticamente diferentes.

30ª. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleico de alta complexidade que mancham de maneira digna de confiança os citados materiais cromossómicos sinalizados, caracterizado pelo facto de os mencionados materiais cromossómicos sinalizados estarem na vizinhança de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos, que são associados, ou com a leucemia mielógena crónica (CML) ou com a leucemia linfocítica crónica (ALL).

31ª. - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos estarem associados com a CML.

32ª. - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de os referidos rearranjos genéticos serem escolhidos do grupo que consiste em translocações, inversões, anulações, inserções e amplificações.

33ª. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo facto de as referidas amostras de ácido nucleico de alta complexidade produzirem uma mancha cujo aspecto é perceptivelmente modificado quando ocorre a fusão característica BCR-ABL da CML e/ou da ALL.

34ª. - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de terem uma complexidade compreendida no intervalo entre cerca de 50 quilobase (kb) e cerca de 1 megabase (Mb).

35ª. - Processo de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de a complexidade estar compreendida no intervalo

lo entre cerca de 50 kb e cerca de 750 kb.

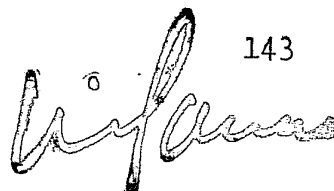
36ª. - Processo de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo facto de a complexidade estar compreendida no intervalo entre cerca de 200 kb e cerca de 400 kb.

37ª. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleico, de elevada complexidade, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de serem substancialmente isentas de sequências repetitivas partilhadas produzidas por um processo que emprega uma reacção de cadeia de polimerase (PCR).

38ª. - Processo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo facto de, durante o referido processo de (PCR), sequências complementares das citadas sequências repetitivas partilhadas que têm as extremidades prolongadas não complementares, ou são terminadas em nucleótidos que não permitem o prolongamento por uma polimerase, serem hibridizadas, com as referidas sequências repetitivas partilhadas a fim de inibirem a amplificação das mencionadas sequências.

39ª. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleico de elevada complexidade para análise citogénica por hibridização "in situ", caracterizado pelo facto de se propagarem as sequências de ácido nucleico numa linha de células híbridas.

40ª. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de a mencionada linha de células híbridas ser uma linha de células híbridas de seres humanos/ani-



— mais roedores.

41^a. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleíco de elevada complexidade, caracterizado pelo facto de alguns elementos das amostras serem marcados de modo a constituírem centrómeros e/ou telómeros de um ou mais cromossomas de um genoma.

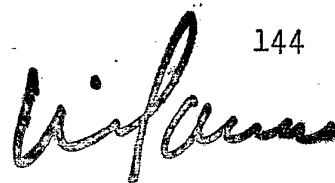
42^a. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleíco de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo facto de os elementos assinalados nos centrómeros serem sequências de satélites-alfa.

43^a. - Processo para a preparação de amostras de elevada complexidade para análise citogenética, por hibridização "si situ", caracterizado pelo facto de o material cromossómico assinalado das citadas amostras ser proveniente de células de fetos que foram separados do sangue materno.

44^a. - Processo para a preparação de amostras de elevada complexidade, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo facto de as mencionadas células de fetos serem separadas do sangue materno por utilização de anticorpos monoclonais específicos para as citadas células de fetos.

45^a. - Processo para a preparação de amostras de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de as referidas células de fetos serem leucócitos e citotrofoflastos.

46^a. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleí-



co de elevada complexidade, caracterizado pelo facto de serem substancialmente isentas de sequências repetitivas partilhadas produzidas por um processo que incorpora uma reacção de cadeia de polimerase (PCR).

47ª. - Processo para a preparação de amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo facto de as sequências que são complementares das citadas sequências repetitivas partilhadas e que têm extremidades prolongadas não complementares, ou que terminam em nucleótidos que não permitem o prolongamento por uma polimerase, serem hibridizadas durante o mencionado processo de PCR, com as referidas sequências repetitivas partilhadas a fim de inibirem a amplificação das mencionadas sequências.

48ª. - Processo para a coloração de material cromossómico sinalizado baseado em amostras de ácido nucleico que empregam uma sequência de ácido nucleico, caracterizado pelo facto de o citado material cromossómico sinalizado estar na proximidade de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos que servem para o diagnóstico da leucemia nucleogénica crónica (CML).

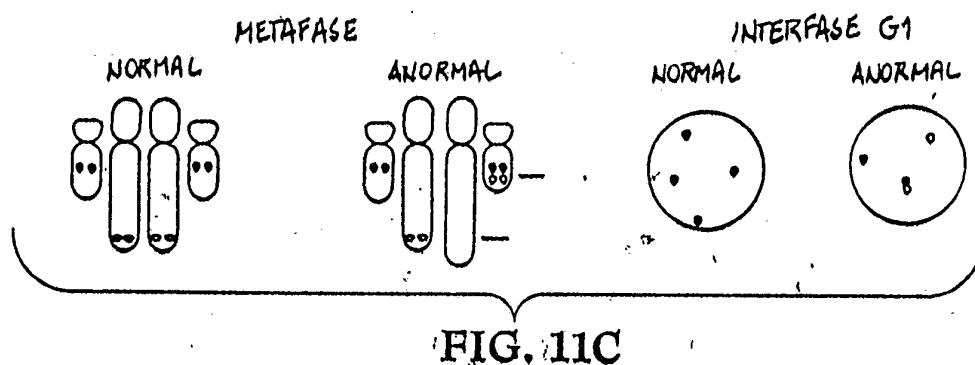
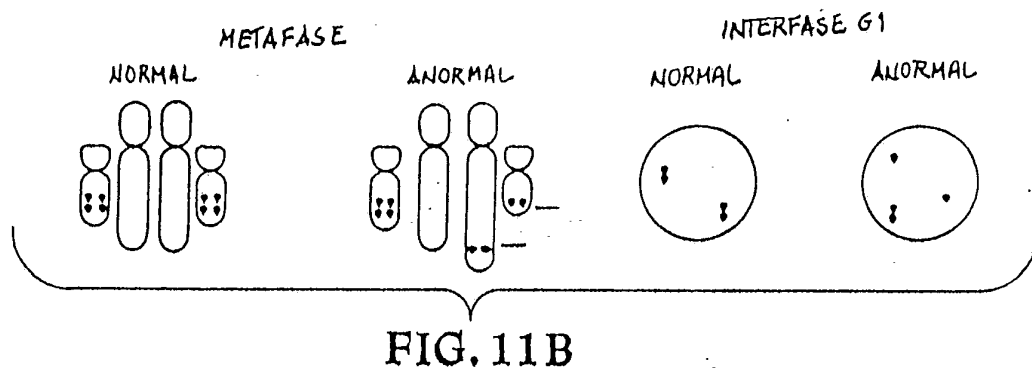
49ª. - Processo de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo facto de o rearranjo genético ser escolhido do grupo que compreende translocações, anulações, inversões, amplificações e inserções.

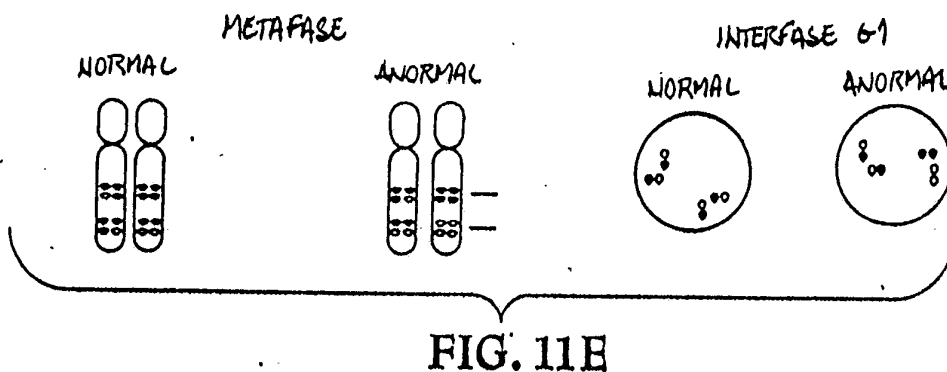
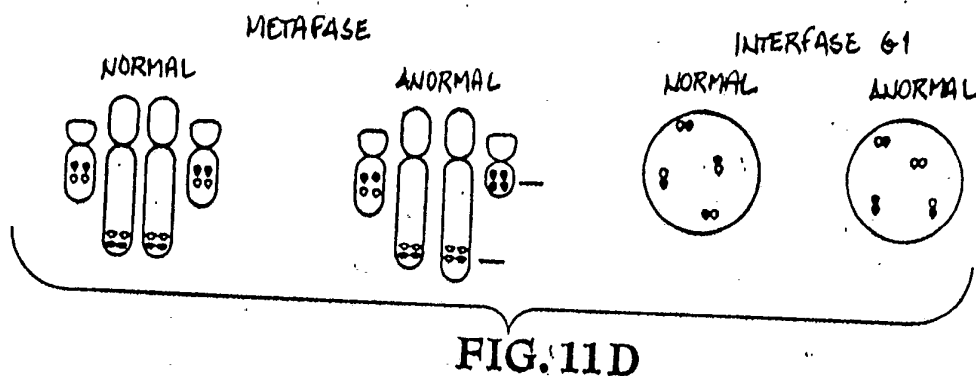
50ª. - Processo de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo facto de as mencionadas amostras de ácido nucleico serem homólogas com as sequências de ácido nucleico na vizinhança das regiões de interrupção da translocação das regiões cro-

— mossómicas 9q34 e 22q11 associadas com CML.

51^a. - Processo de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo facto de as referidas amostras de ácido nucleico produzirem um aspecto do mancharamento que é perceptivelmente modificado quando ocorre a fusão BCR-ABL característica da CML.

52^a. - Processo de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo facto de os sinais provenientes das referidas amostras de ácido nucleico quando hibridizadas com as citadas sequências do ácido nucleico, originarem aspectos de manchas característicos, indicados nas figuras 11B e 11E.





53ª. - Processo de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo facto de a proximidade das e/ou de outras características de sinais do citado aspecto da mancha indicarem se está presente ou não a referida fusão BCR-ABL.

54ª. - Processo de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo facto de a parte da amostra da região BCR ser marcada/visualizada de uma maneira e a parte da amostra da região ABL ser marcada/visualizada de modo que quando está presente a fusão BCR-ABL, a proximidade dos dois mencionados meios de marcação/visualização se tornar relativamente estreita numa

Wifama

— sequência cromossômica de interfase e/ou metafase.

55ª. - Processo de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo facto de as citadas amostras de ácido nucleico terem uma complexidade compreendida no intervalo entre cerca de 50 quilobases (kb) e cerca de 1 megabase (Mb).

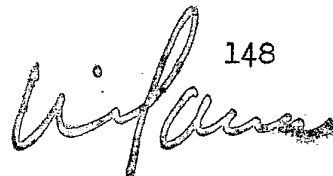
56ª. - Processo de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo facto de a complexidade estar compreendida no intervalo entre cerca de 50 kb e cerca de 750 kb.

57ª. - Processo de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo facto de a complexidade estar compreendida no intervalo entre cerca de 200 kb e cerca de 400 kb.

58ª. - Processo para a coloração de material cromossômico sinalizado baseado em amostras de ácido nucleico que empregam sequências de ácido nucleico, caracterizado pelo facto de o citado material cromossômico sinalizado estar na proximidade de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos associados ou com leucemia mielogénica crónica (CML) e/ou com leucemia linfocítica aguda (ALL).

59ª. - Processo de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo facto de as mencionadas amostras de ácido nucleico produzirem modelos de manchas que permitem distinguir entre um rearranjo genético associado com a leucemia mielogénica crónica (CML) e o arranjo associado com leucemia linfocítica aguda (ALL).

60ª. - Processo de coloração do material cromossômico baseado



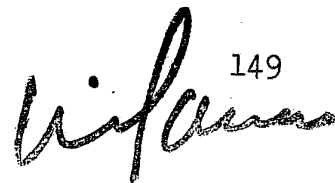
em amostras de ácido nucleico que empregam sequências de ácido nucleico, caracterizado pelo facto de o referido material cromossómico sinalizado ser formado por células de fetos que foram separadas do sangue materno.

61^a. - Processo para distinguir rearranjos genéticos associados com leucemia mielogénica crónica (CML) e leucemia linfocítica aguda (ALL), caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em

- a) se hibridizar as amostras de acordo com a reivindicação 27, com material cromossómico sinalizado na vizinhança de um rearranjo genético suspeito;
- b) se observar e/ou se medir a proximidade e/ou outras características dos sinais provenientes das mencionadas amostras; e
- c) se determinar, a partir das citadas observações e/ou medições obtidas na operação b), se ocorreu ou não um rearranjo genético.

62^a. - Processo para detectar rearranjos genéticos associados com CML de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo facto de as amostras da operação a) serem amostras de ácido nucleico de alta complexidade que mancham os materiais cromossómicos sinalizados na vizinhança de um ou mais rearranjos genéticos suspeitos que são diagnóstico para CML.

63^a. - Processo de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo facto de a leucemia ser CML e o rearranjo genético a ser detectado produzir uma fusão BCR-ABL.



64ª. - Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo facto de o material cromossómico estar ou em metafase ou em interfase.

65ª. - Processo de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo facto de o material estar em metafase.

66ª. - Processo de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo facto de o material cromossómico estar em interfase.

67ª. - Processo de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo facto de os aspectos das manchas assim produzidos serem usados para distinguir células normais e células malignas, com a finalidade de se efectuar um prognóstico e/ou se determinar a eficácia da terapia.

68ª. - Processo de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo facto de os regimes para a mencionada terapia serem escolhidos do grupo formado por quimioterapia, radiação, cirurgia e transplante.

69ª. - Processo de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo facto de os modelos de manchas assim produzidas serem úteis para o controlo do estado de um paciente cujo material cromossómico é ensaiado na base de células após célula.

70ª. - Processo para distinguir entre CML e ALL, caracterizado pelo facto de se basear nos modelos das manchas produzidas de acordo com o processo da reivindicação 61.

71ª. - Processo de acordo com a reivindicação 69, caracteriza-

do pelo facto de o paciente estar em remissão e os modelos de manchas produzidas serem um prenúncio de uma repetição da OML.

72ª. - Processo para determinar a base molecular de uma doença genética, caracterizado pelo facto de compreender a hibridização de amostras de ácido nucleico de elevada complexidade que mancham materiais cromossómicos assinalados, sendo os mencionados materiais cromossómicos assinalados provenientes de seres humanos, escolhidos do ADN dos cromossomas 1 até 22, x e y, e estarem na vizinhança de um ou mais potenciais rearranjos genéticos.

73ª. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado na vizinhança de um rearranjo genético suspeito associado com a leucemia mielogénica crónica (OML) com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de as sequências de ácido nucleico das amostras antes da hibridização com o material cromossómico assinalado, serem partidas em fragmentos com desde cerca de 200 bases até cerca de 2 000 bases.

74ª. - Processo de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo facto de o tamanho dos fragmentos ser igual a cerca de 1 kb.

75ª. - Processo de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo facto de o tamanho dos fragmentos estar compreendido entre cerca de 800 bases e cerca de 1 000 bases e a hibridização ser realizada a uma temperatura compreendida no intervalo entre cerca de 30°C e cerca de 45°C, e as subseqüentes operações de lavagem serem efectuadas a uma temperatura compreendida no intervalo entre cerca de 40°C e cerca de 50°C.

76ª. - Processo de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo facto de a hibridização ser realizada a uma temperatura compreendida no intervalo entre cerca de 35°C e cerca de 40°C.

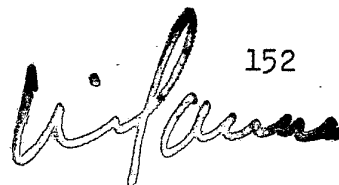
77ª. - Processo de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo facto de a hibridização ser efectuada a uma temperatura igual a cerca de 37°C, e as subsequentes operações de lavagem serem realizadas a uma temperatura igual a cerca de 45°C.

78ª. - Processo de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo facto de os fragmentos serem marcados/visualizados para detecção após a hibridização por meio de citometria de passagem.

79ª. - Processo de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo facto de os fragmentos serem marcados/visualizados para detecção por microscopia.

80ª. - Processo de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo facto de a microscopia ser microscopia com imagem obtida por processamento por computador.

81ª. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 31, para produzir modelos de manchamento indicativos de rearranjos genéticos associados com CNL, caracterizado pelo facto de se hibridizarem sequências de ácido nucleico repetitivas de grau de cópia elevada não marcadas ou ADN genómico como material cromossómico assinalado antes da ou durante a hibridização com a amostra de áci-



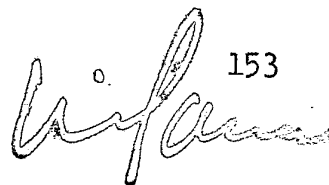
do nucleico de elevada complexidade.

82ª. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado, com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 31, para produzir modelos de manchas indicativos de rearranjos genéticos associados com CML, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em se obter uma mistura heterogénea de fragmentos de ácido nucleico marcados em que proporções substanciais dos fragmentos do ácido nucleico marcados na mistura heterogénea possuem sequências de base substancialmente complementares do material cromossómico assinalado o qual fica na proximidade de um rearranjo genético suspeito associado com CML; se fazer reagir a mistura heterogénea com o ADN cromossómico marcado por hibridização "in situ"; e

se observar e/ou se medir a proximidade e/ou outras características de sinais dos citados modelos de manchas, para determinar se ocorreu ou não um rearranjo genético.

83ª. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado, na vizinhança de um rearranjo genético suspeito associado com CML, com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de as amostras não serem directamente marcadas e a detecção das amostras ligadas ao material cromossómico assinalado se realizar por meios diferentes de marcação directa.

84ª. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo facto de os meios de detecção das amostras ligadas ao material cromossómico assinalado compreenderem o uso de anticorpos duplos anti-ARN/ADN e/ou de anticorpos dímeros anti-



— timidina.

85^a. - Processo para distinguir entre rearranjos genéticos suspeitos que ocorrem na proximidade relativamente apertada dum genoma, caracterizado pelo facto de compreender a hibridização "in situ" com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, as quais compreendem sequências que são substancialmente homólogas das sequências de ácido nucleico na vizinhança dos mencionados rearranjos genéticos suspeitos.

86^a. - Processo de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo facto de os citados rearranjos suspeitos serem associados com OML e/ou ALL.

87^a. - Processo para detectar um síndrome genético contíguo, caracterizado pelo facto de compreender a hibridização "in situ" de amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, as quais compreendem sequências substancialmente homólogas das sequências de ácido nucleico características de um ou mais componentes da citada síndrome genética contígua.

88^a. - Processo de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo facto de a referida síndrome genética contígua ser a síndrome de Down.

89^a. - Processo para a pesquisa de um ou mais rearranjos genéticos numa região cromossómica de um genoma indicado pela análise convencional de bandas como contendo uma anormalidade, caracterizado pelo facto de compreender a hibridização "in situ" com o citado genoma de um reagente de manbamento específico de cromossomas, preparado pelas operações que consistem

em

- a) se isolar ADN específico dos cromossomas, proveniente da citada região cromossômica;
- b) se amplificar troços do referido ADN específico dos cromossomas, isolado; e
- c) se anular a capacidade de hibridização das sequências e/ou se remover as sequências repetitivas partilhadas contidas nos troços amplificados do ADN isolado, para formar uma colecção de fragmentos de ácido nucleico, que se hibridizam predominantemente, com a região cromossômica assinalada; e se marcar a colecção de fragmentos de ácido nucleico para formar uma mistura heterogénea de fragmentos de ácido nucleico marcados.

90ª. - Processo para o manchamento de material cromossômico baseado em amostras de ácido nucleico que empregam sequências de ácido nucleico, caracterizado pelo facto de o material cromossômico ser constituído por um ou mais cromossomas em metafase e/ou em interfase, ou uma ou várias regiões dos referidos cromossomas e por células de fetos separados do sangue materno.

91ª. - Processo para o manchamento de material cromossômico assinalado, com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, caracterizado pelo facto de as sequências de ácido nucleico das amostras, antes da hibridização com o material cromossômico assinalado, serem cortadas em fragmentos com desde cerca de 200 bases até cerca de 2 000 bases.

92ª. - Processo de acordo com a reivindicação 91, caracteriza-

do pelo facto de o tamanho dos fragmentos ser igual a cerca de 1 kb.

93ª. - Processo de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo facto de o tamanho dos fragmentos estar compreendido entre cerca de 800 bases e cerca de 1 000 bases e a hibridização ser realizada a uma temperatura compreendida no intervalo entre cerca de 30°C e cerca de 45°C, e as subsequentes operações de lavagem serem efectuadas a uma temperatura compreendida no intervalo entre cerca de 40°C e cerca de 50°C.

94ª. - Processo de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo facto de a hibridização ser realizada a uma temperatura compreendida no intervalo entre cerca de 35°C e cerca de 40°C.

95ª. - Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo facto de a hibridização ser efectuada a uma temperatura igual a cerca de 37°C, e as subsequentes operações de lavagem serem realizadas a uma temperatura igual a cerca de 45°C.

96ª. - Processo de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo facto de os fragmentos parcados após a hibridização serem detectados por citometria de passagem.

97ª. - Processo de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo facto de a referida detecção ser realizada por microscopia.

98ª. - Processo de acordo com a reivindicação 97, caracteriza-

do pelo facto de a citada microscopia utilizar a formação da imagem controlada por computador.

99^a. - Processo de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo facto de se empregar a dispersão da luz.

100^a. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado de células de fetos com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, caracterizado pelo facto de as referidas células dos fetos serem separados do sangue materno.

101^a. - Processo de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo facto de as mencionadas células de fetos serem separadas do sangue materno mediante a utilização de anticorpos específicos para as citadas células de fetos.

102^a. - Processo de acordo com a reivindicação 101, caracterizado pelo facto de as referidas células de fetos serem leucócitos e citotrofoblastos.

103^a. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado com amostras de ácido nucleico de elevada complexidade, caracterizado pelo facto de as amostras não serem directamente marcadas e a detecção das amostras ligadas ao material cromossómico assinalado ser realizada por meios diferentes de marcação directa.

104^a. - Processo para o manchamento de material cromossómico assinalado, de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo facto de os meios de detecção das amostras ligadas ao ma-

terial cromossómico assinalado compreendem o uso de anticorpos duplos anti-ARN/ADN e/ou anticorpos diméricos antitimidina.

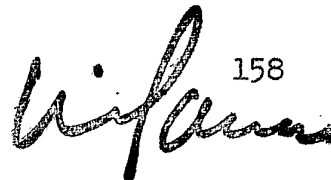
105^a. - Processo para detectar anormalidades citogenéticas em cromossomas, caracterizado pelo facto de comoreender as operações que consistem em

- a) se hibridizar amostras de ácido nucleico marcado/visualizável, de elevada complexidade, assinaladas, com duas ou mais regiões cromossómicas de um genoma suspeitas de conterem uma normalidade citogenética, para produzir um modelo de duas ou mais bandas de manchas;
- b) se comparar o modelo das bandas produzidas na operação (a) com um modelo obtido por hibridização das referidas amostras com material cromossómico normal da mesma espécie que o suspeito de conter a anormalidade; e
- c) se detectarem quaisquer diferenças entre o modelo de bandagem produzida na operação (a) com o modelo normal.

106^a. - Processo de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo facto de os cromossomas estarem em metafase.

107^a. - Processo de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo facto de os cromossomas estarem em interfase.

108^a. - Processo de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo facto de o modelo de bandas compreender duas regiões manchadas e a anormalidade citogenética de que se suspeita ser um rearranjo genético associado com leucemia nucle-



génica crónica (CML).

109ª. - Processo de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo facto de a detecção ser efectuada com meios automatizados.

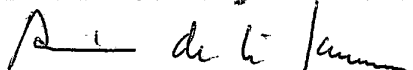
110ª. - Processo de acordo com a reivindicação 109, caracterizado pelo facto de a detecção ser realizada por microscopia auxiliada por computador.

111ª. - Estojo para a realização dos ensaios de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, contendo amostras de ácido nucleico de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 31.

112ª. - Estojo para a realização dos ensaios de detecção de anormalidades cromossómicas pré-natal compreendendo amostras de ácido nucleico de elevada complexidade de acordo com a reivindicação 43.

Lisboa, 18 de Julho de 1990

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



Américo da Silva Carvalho
Agente Oficial de Propriedade Industrial
R. Castilho, 201-3. E.-1000 LISBOA
Telefs. 65 13 39 - 65 46 13

Li Pann

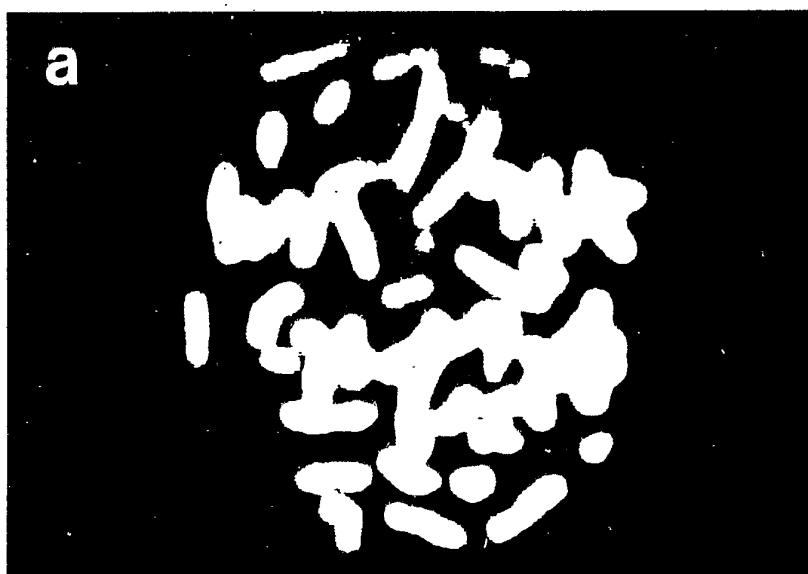


FIG. 1A

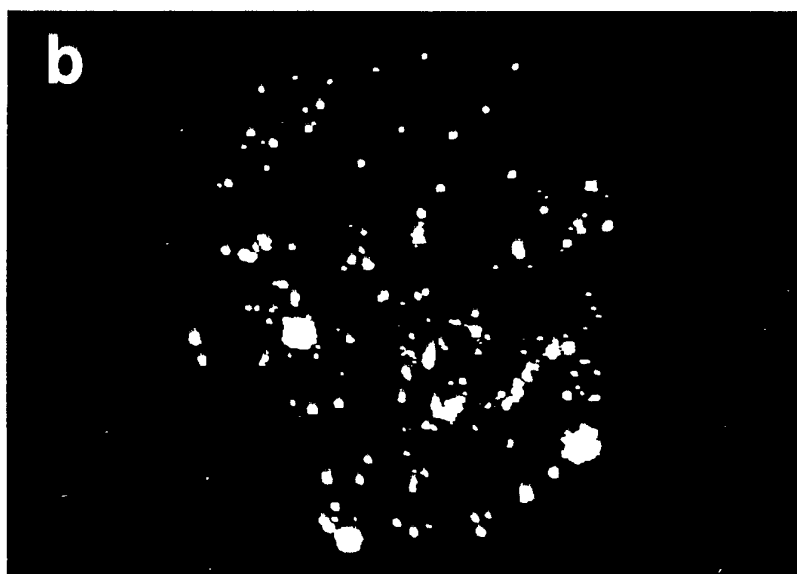


FIG. 1B

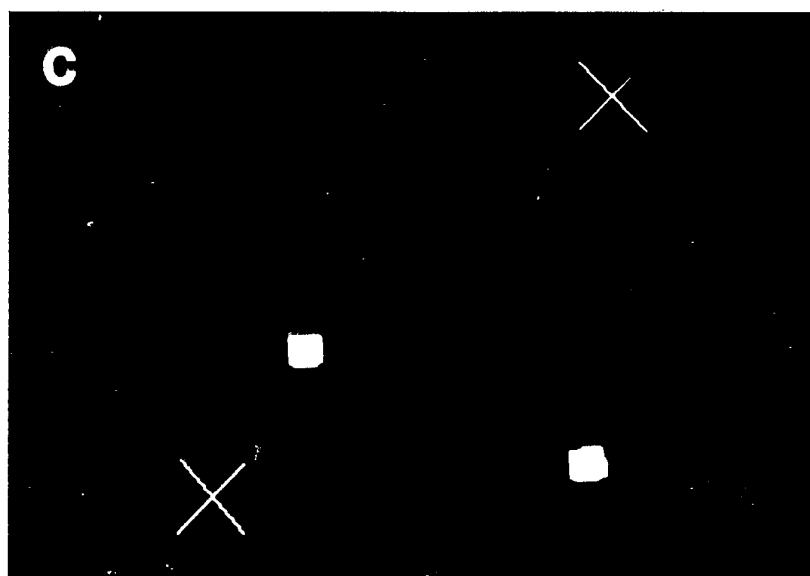


FIG. 1C

Desenhos 12-nº2

Wif



FIG. 2A

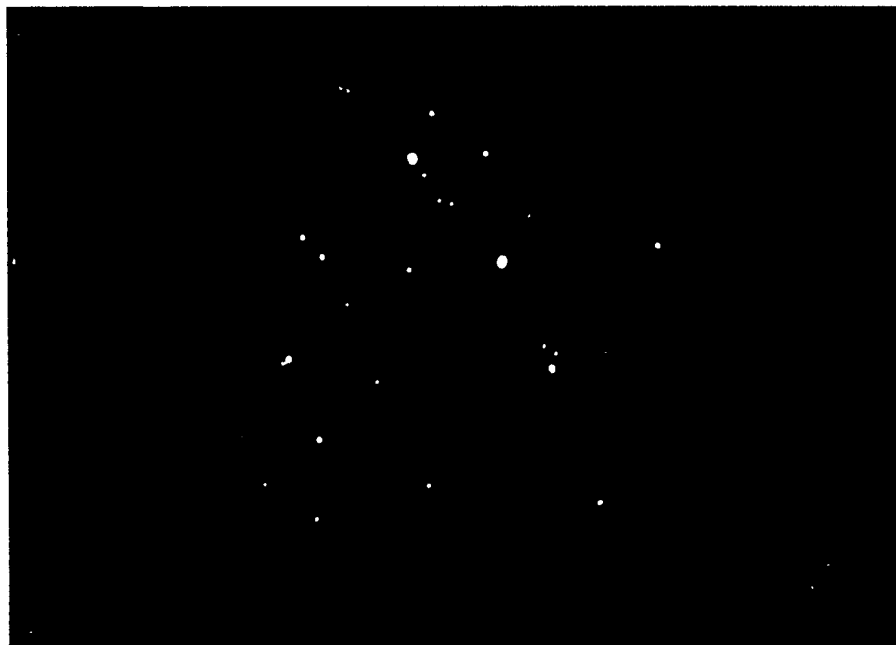


FIG. 2B

The Regents of the University of California



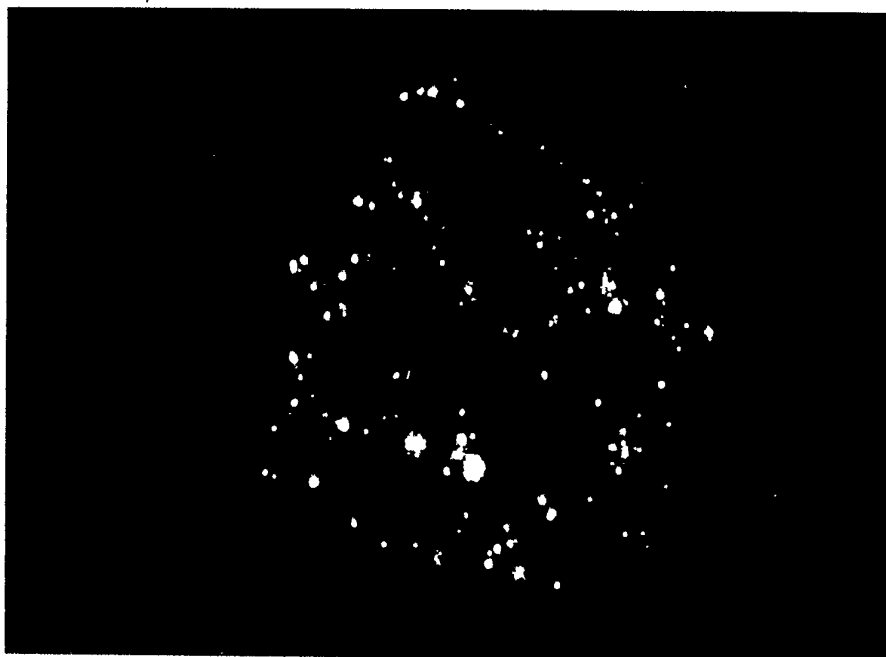


FIG. 3



FIG.
4A



FIG.
4B



FIG.
4C



FIG.
4 D



FIG.
4 E



FIG.
4 F

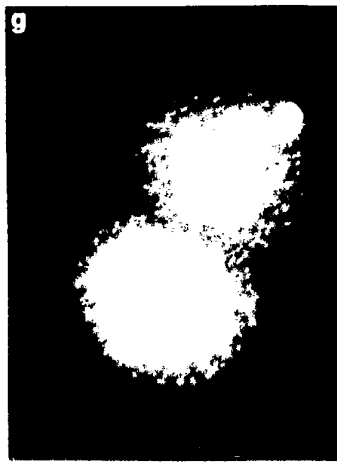


FIG.
4 G



FIG.
4 H

The Regents of the University of California



FIG. 5

Wifann

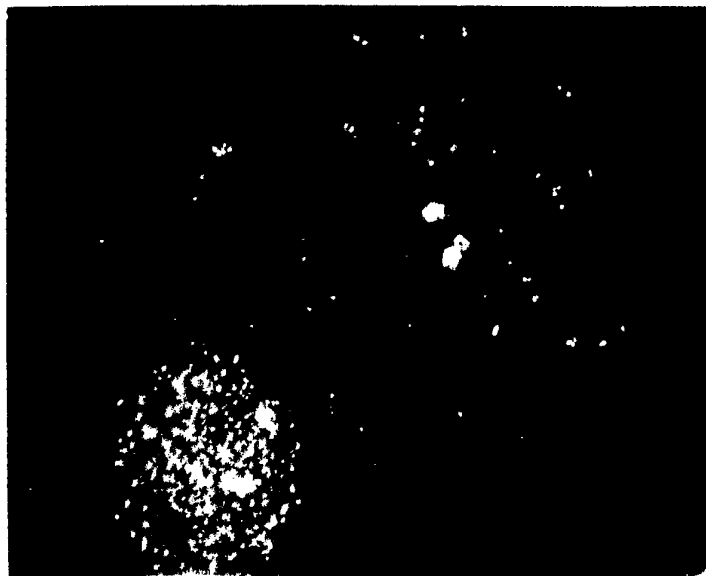


FIG. 6

The Regents of the University of California



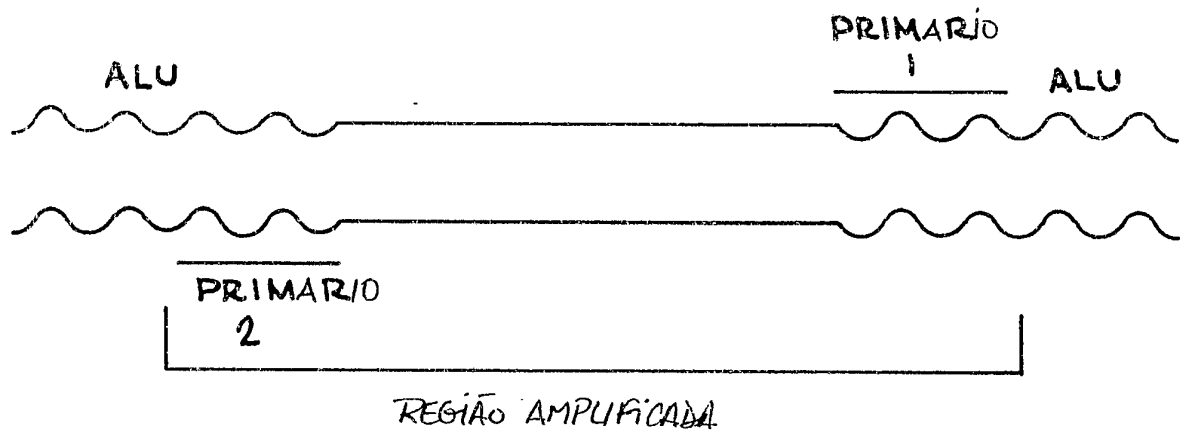


FIG. 7

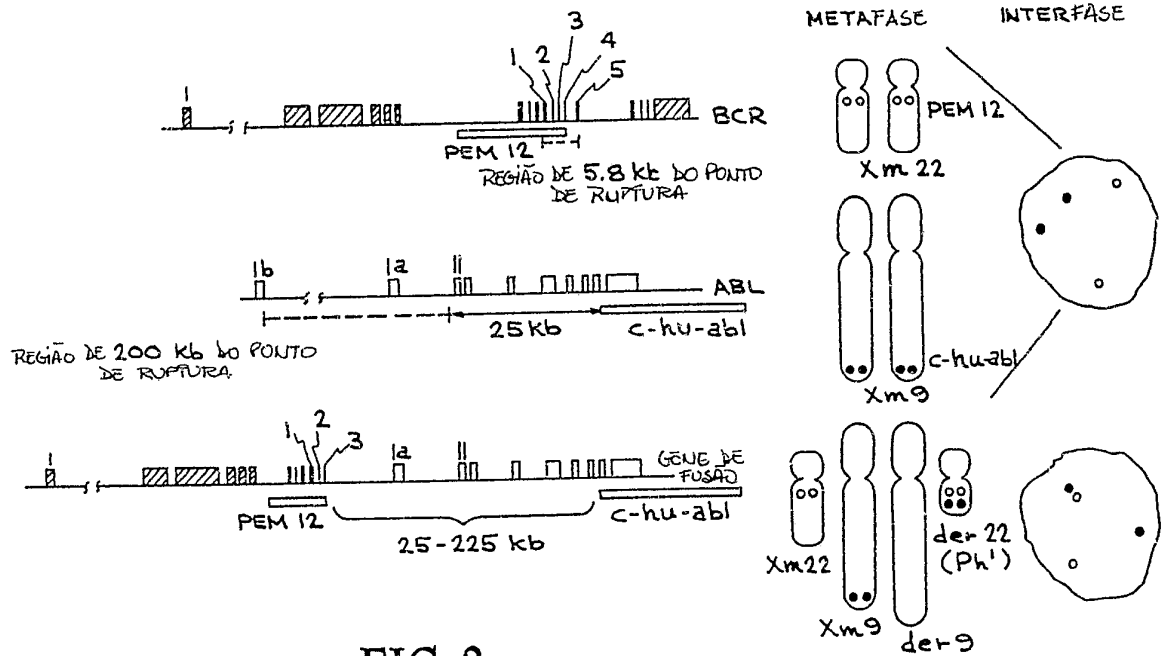


FIG. 8

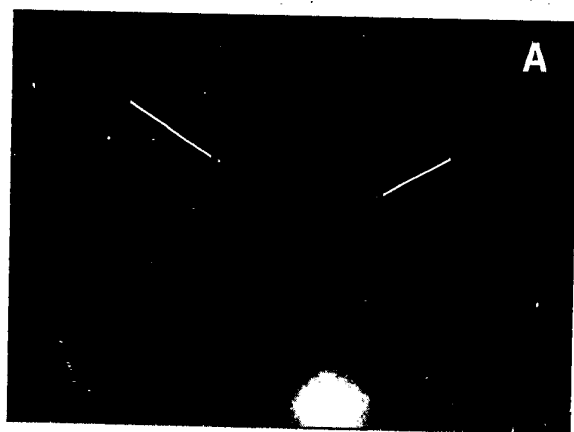


FIG. 9A



FIG. 9B

Wifano

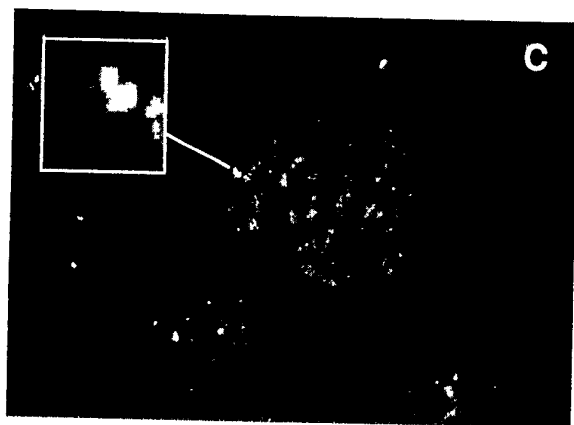


FIG. 9C

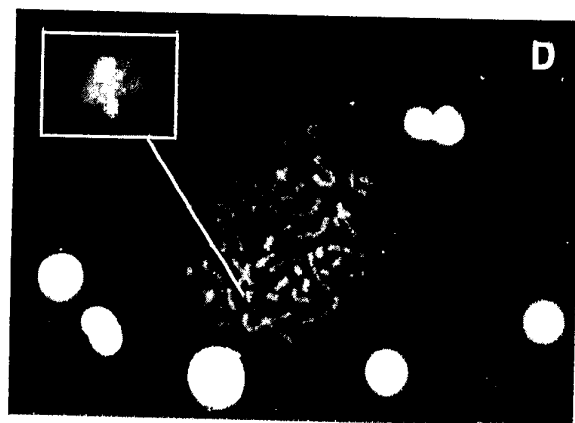


FIG. 9D

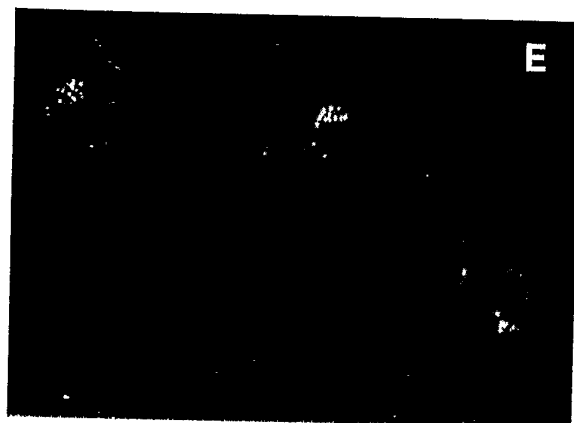


FIG. 9E

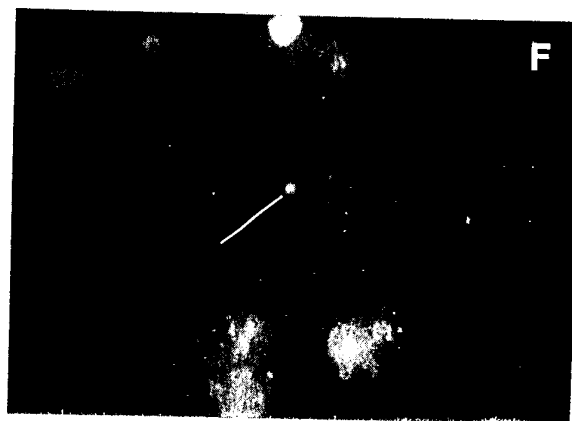


FIG. 9F

The Regents of the University of California



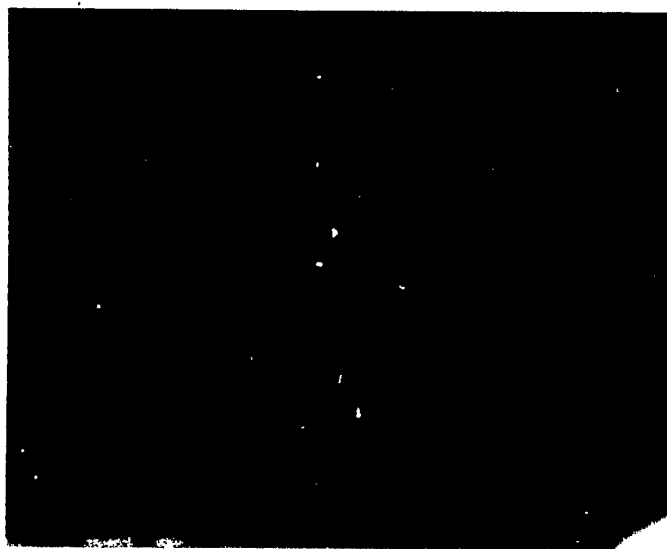


FIG. 10

Wifama

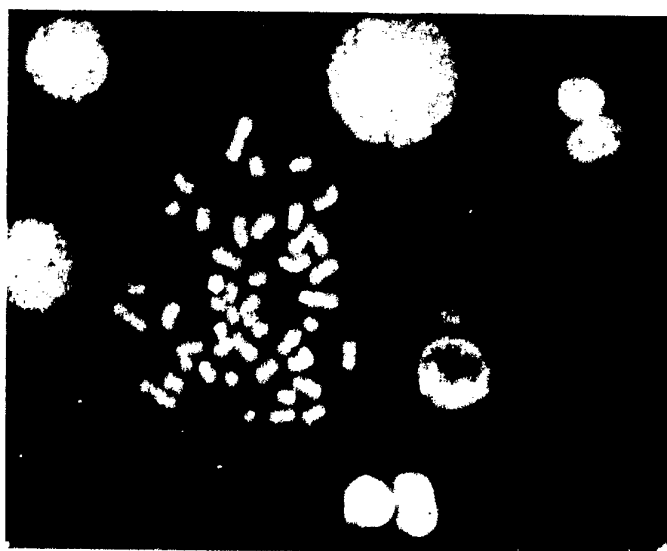
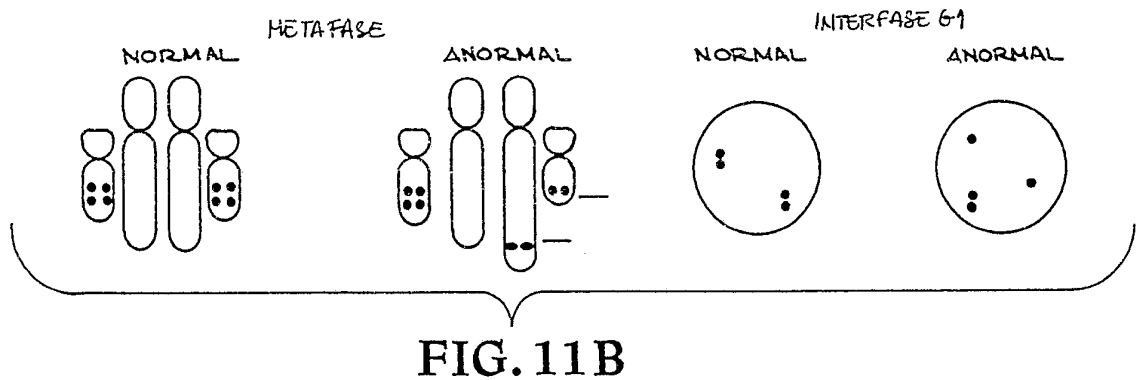
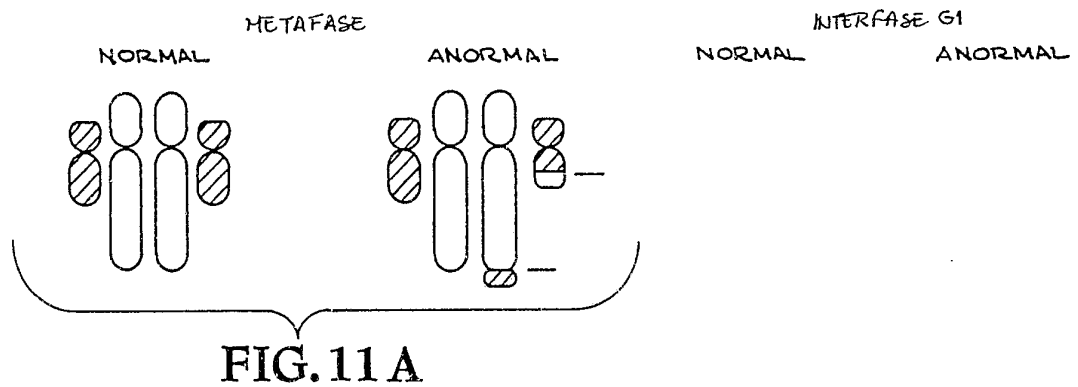


FIG. 12

The Regents of the University of California



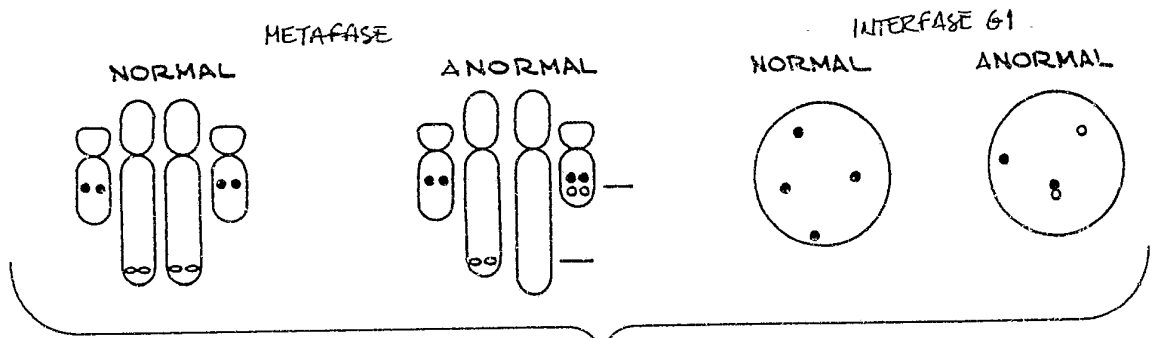


FIG. 11C

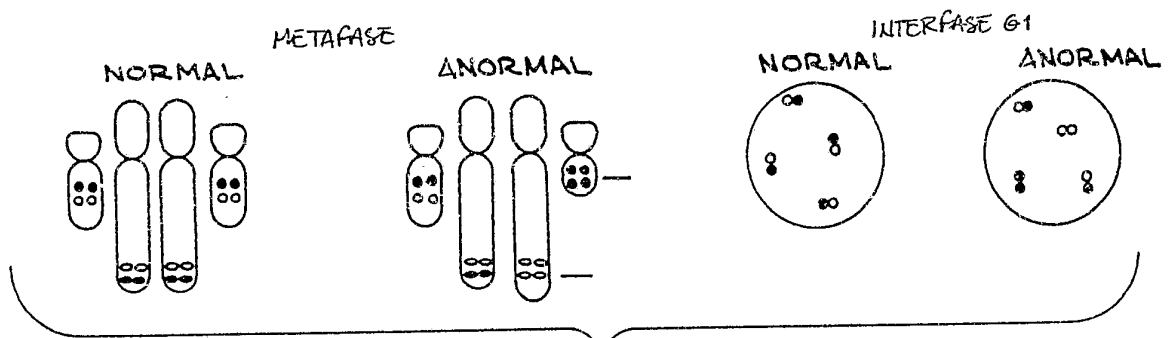


FIG. 11D

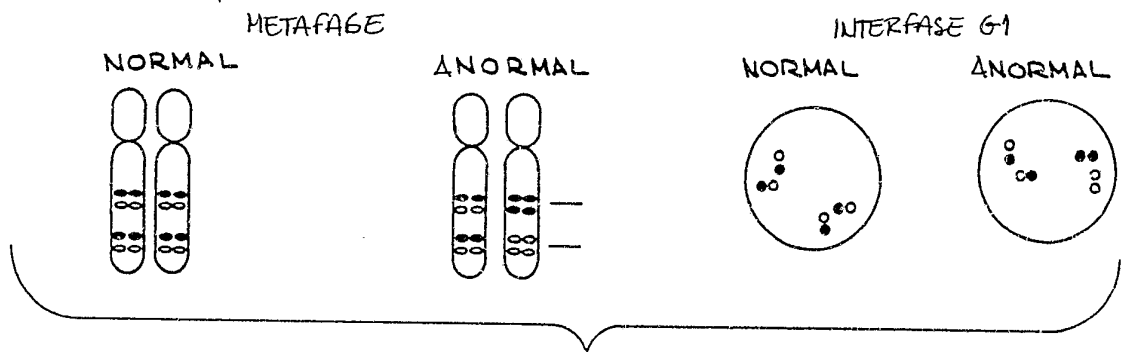


FIG. 11E

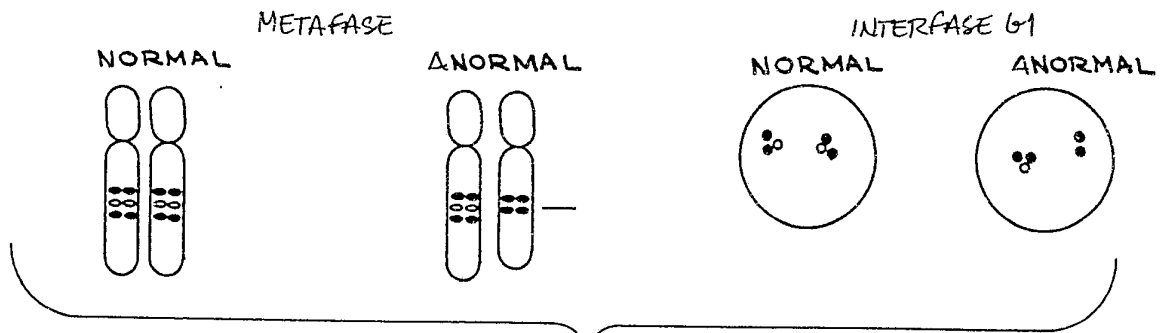


FIG. 11F