

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.11.06	(73) Titular(es): ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM DR. MOLEWATERPLEIN 50 3015 GE ROTTERDAM NL
(30) Prioridade(s): 2002.11.07 EP 02079666	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.08.24	
(45) Data e BPI da concessão: 2010.09.08 235/2010	(72) Inventor(es): JACOBUS JOHANNES MARIA VAN DONGEN NL
	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO E SONDAS PARA A DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO ESPECÍFICA A UM TUMOR**

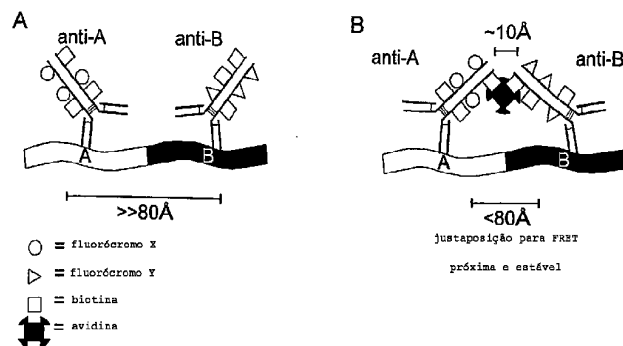
(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO REFERE-SE À DETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO. A INVENÇÃO PROPORCIONA UM CONJUNTO DE PELO MENOS UMA PRIMEIRA E UMA SEGUNDA SONDAS MOLECULARES, CADA SONDA PROPORCIONADA COM UM CORANTE EM QUE OS REFERIDOS CORANTES, EM CONJUNTO, PERMITEM A TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA; PELO MENOS UMA SONDA PROPORCIONADA COM UM GRUPO REACTIVO QUE PERMITE A JUSTAPOSIÇÃO DA REFERIDA , PELO MENOS, PRIMEIRA E SEGUNDA SONDAS EM QUE O REFERIDO GRUPO REACTIVO PERMITE MODULAR A JUSTAPOSIÇÃO DAS REFERIDAS SONDAS DE TAL MODO QUE HÁ UMA MAIOR PROBABILIDADE DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE OS REFERIDOS CORANTES. É PROPORCIONADO UM MÉTODO QUE PERMITE A DETECÇÃO DA PRESENÇA DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO NUMA CÉLULA AO NÍVEL DE CÉLULA ÚNICA.

RESUMO

"MÉTODO E SONDAS PARA A DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO ESPECÍFICA A UM TUMOR"

Esta invenção refere-se à detecção de proteínas de fusão. A invenção proporciona um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sondas moleculares, cada sonda proporcionada com um corante em que os referidos corantes, em conjunto, permitem a transferência de energia; pelo menos uma sonda proporcionada com um grupo reactivo que permite a justaposição da referida, pelo menos, primeira e segunda sondas em que o referido grupo reactivo permite modular a justaposição das referidas sondas de tal modo que há uma maior probabilidade de transferência de energia entre os referidos corantes. É proporcionado um método que permite a detecção da presença de uma proteína de fusão numa célula ao nível de célula única.



DESCRIÇÃO

"MÉTODO E SONDAS PARA A DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO ESPECÍFICA A UM TUMOR"

Esta invenção refere-se à detecção de, entre outras, proteínas de fusão específicas do tumor. Mais especificamente, a invenção refere-se a técnicas que indicam a presença de translocações cromossómicas por meio da detecção da presença de uma proteína de fusão ao nível de célula única. No diagnóstico de vários tipos de cancro, tais como leucemias, linfomas e tumores sólidos, as aberrações cromossómicas são frequentemente utilizadas para a classificação em subgrupos¹ relevantes do ponto de vista do prognóstico. Muitas destas aberrações cromossómicas resultam em genes de fusão, isto é, genes acoplados de modo aberrante através da parte a montante de um gene para a parte a jusante do outro gene, ou vice versa. Os genes de fusão podem ser transcritos para gene de fusão transcritos e traduzidos em proteínas de fusão. De um modo geral, as proteínas de fusão desempenham um papel importante no processo oncogenético. Até agora, foram descritos mais de uma centena de genes de fusão diferentes e proteínas de fusão em vários tipos de cancro.²⁻⁵

O termo "cancro" compreende um grupo heterogéneo de neoplasmas, no qual cada tipo tem as suas próprias características, quando considerado o seu potencial maligno e a sua resposta à terapia. É evidente que o diagnóstico preciso e a classificação dos vários tipos de cancro é fundamental para ajudar a seleccionar a terapia mais eficaz. Além disso, um método de diagnóstico que

permite a detecção de pequenos números de células malignas num fundo elevado de células normais durante a terapia é essencial para avaliar a eficácia do tratamento e para antecipar uma iminente recidiva.

As translocações cromossómicas podem ser detectadas por meio de uma grande variedade de técnicas, a maioria das quais envolve tecnologia biomolecular moderna. As técnicas citogenéticas incluem técnicas convencionais de formação de bandas cromossómicas (cariotipagem) e hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) que utiliza sondas marcadas fluorescentemente. As estratégias com base em reacção em cadeia da polimerase (PCR) podem ser utilizadas para detectar fusões de pontos de ruptura do cromossoma como pode ser encontrado em translocações, inversões e deleções cromossómicas, utilizando iniciadores localizados em cada lado do ponto de ruptura. A amplificação do ADN só pode ser utilizada para aberrações cromossómicas em que os pontos de ruptura se agrupam numa pequena área. Na maior parte dos casos, os pontos de ruptura empalham-se ao longo de grandes regiões intrónicas, mas várias translocações, inversões e deleções dão origem a genes de fusão e transcritos de fusão adequadas para amplificação por PCR após uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR).

As técnicas mais vulgarmente utilizadas, destinadas a detectar aberrações cromossómicas específicas envolvem a análise ao nível cromossómico ou do ácido nucleico (ADN ou ARN). Uma vantagem de tais marcadores de fusão genética é o seu envolvimento directo na oncogénese. Em concordância, a sua presença é constante ao longo de toda a evolução da doença. No entanto, uma grande desvantagem dos marcadores de fusão refere-se ao facto de que as variações no nível

da transcrição de genes e/ou tradução de genes durante a doença e, particularmente durante a terapia, não podem ser excluídas. Deste modo, as variações na expressão de um transcrito génico de fusão ou uma proteína de fusão tornam difícil de correlacionar o nível de detecção do marcador com a quantidade de células malignas. Isto implica que a detecção de um produto de gene de fusão é realizada, de preferência, ao nível da proteína em células individuais.

Uma proteína de fusão compreende partes de pelo menos duas proteínas que correspondem aos genes originalmente separados e foram originariamente transcritas pelos mesmos e traduzidos dos mesmos. As proteínas de fusão são especificamente caracterizadas por um ponto de fusão, onde as duas proteínas se encontram. Os pontos de fusão são frequentemente antigenicamente expostos, compreendendo epítomos distintos que por vezes podem ser imunologicamente detectados.

Inicialmente, foram feitas tentativas para produzir anticorpos específicos para proteína de fusão através da produção de anticorpos contra um péptido correspondente à região de ligação de uma proteína de fusão. Esta abordagem raramente tem sido bem sucedida, principalmente devido ao facto de que é difícil encontrar reagentes imunológicos que são exclusivamente reactivos com uma proteína de fusão e não com as proteínas de não-fusão, que são normalmente produzidas numa célula. Se foram obtidos anticorpos específicos de fusão, os mesmos não eram geralmente aplicáveis a microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.⁶⁻⁸ Por exemplo, o anticorpo ERP-FP1 contra a proteína de fusão BCR-ABL funciona bem em procedimentos de transferência de Western, mas não é bem sucedido em

estudos microscópicos em leucemias humanas BCR-ABL positivas.^{6,7} Além disso, considerando a grande variação dentro de rearranjos individuais observados em translocações cromossómicas e dependendo da localização do ponto de ruptura dentro do gene não-aberrante em que (mesmo quando as translocações ocorrem dentro dos mesmos dois genes) podem ser geradas diferentes de fusão proteínas, é considerado provável que dentro de cada caso separado de proteínas de fusão, surjam novos pontos de fusão. Por conseguinte, a detecção de proteínas de fusão pela detecção imunológica específica do epítipo de ponto de fusão da proteína de fusão, nunca foi amplamente aplicável.

Um método alternativo para a detecção específica de proteínas de fusão envolve a aplicação de um chamado anticorpo de captura que reconhece uma parte de uma proteína de fusão e um anticorpo de detecção marcado que reconhece uma outra parte de uma proteína de fusão. Num tal sistema, um anticorpo de captura é ligado a uma camada de suporte sólido, tal como uma placa ELISA ou uma fita de teste. Um anticorpo de captura também podem ser imobilizado em contas que podem ser analisadas por citometria de fluxo.⁹ Após a incubação de um anticorpo de captura com um lisado celular suspeito de conter a proteína de fusão, a proteína de fusão ligada é detectada por um anticorpo de detecção marcado. Embora elegante e fácil de realizar, um sistema de captura/detecção de anticorpo praticamente não pode ser aplicado para detectar uma proteína de fusão intracelular sem perturbar a integridade celular. A maioria das proteínas de fusão específicas de tumores estão localizadas intracelularmente, por exemplo, factores de transcrição

nucleares, ou moléculas de sinalização que residem no citoplasma ou que transitam entre o citoplasma e o núcleo. Assim, um sistema de captura/detecção de anticorpo não permite a detecção de uma proteína de fusão intracelular no nível de célula única.

A co-localização de dois anticorpos marcados diferencialmente contra duas partes diferentes de uma proteína de fusão pode, em teoria, provar a presença de uma proteína de fusão numa célula única. No entanto, à prova total de co-localização requer análise através de microscopia de varrimento a laser (CLSM). Mesmo assim, geralmente não é simples avaliar a co-localização de dois anticorpos, porque as proteínas normais reconhecidas, que são derivadas dos genes normais nos cromossomas não afectados, podem causar uma coloração de fundo, que interfere com a detecção da proteína de fusão. Além disso, a CLSM tem a grande desvantagem de necessitar de um laboratório especializado e bem equipado e de pessoal treinado e altamente especializado. Tal tarefa demorada e técnica altamente especializada não é desejável para procedimentos de diagnóstico de rotina, por exemplo, num cenário clínico.

Todo o acima relatado indica que há uma necessidade específica de um método melhorado para detectar uma proteína de fusão, que pode, preferencialmente, ser usado num laboratório clínico. Particularmente desafiante é a detecção de uma proteína de fusão intracelular ao nível de célula única.

A invenção proporciona a constatação de que a tecnologia de transferência de energia por ressonância de

fluorescência (FRET) pode ser utilizada para detectar a presença de uma proteína de fusão. A invenção proporciona um conjunto de sondas, um kit para diagnóstico e um método para detectar a presença de uma proteína de fusão, conforme descrito nas reivindicações anexas. A invenção proporciona um método in vitro para detectar a presença de uma proteína de fusão numa célula utilizando um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sonda molecular, cada sonda capaz de reconhecer um local de ligação posicionado em lados opostos da região de fusão da referida proteína de fusão, cada sonda também proporcionada com um corante em que os referidos corantes, em conjunto, permitem a transferência de energia, cada sonda proporcionada com um grupo reactivo que permite modular a organização espacial das referidas sondas depois de ligação à molécula de interesse fazendo com que os referidos corantes fiquem a uma distância de 100 Ångstrom uns dos outros de tal modo que há uma crescente possibilidade de transferência de energia entre os corantes, em que um grupo reactivo da referida primeira sonda não está envolvido na ligação à molécula de interesse e não é directamente reactivo com as referidas segundas sondas e requer uma substância de ligação capaz de ligar pelo menos dois grupos reactivos para mediar a transferência de energia entre os corantes nas referidas sondas, o método compreendendo proporcionar um conjunto de sondas, proporcionar uma amostra que compreende uma célula, pôr a referida amostra em contacto com as referidas sondas em condições que permitem justapor as referidas sondas sobre a referida proteína de fusão, pôr as referidas sondas em contacto com uma substância de ligação capaz de ligar pelo menos um grupo reactivo da referida primeira sonda à referida segunda sonda e

detectar a justaposição das referidas sondas através de FRET para determinar a presença da referida proteína de fusão. É também proporcionado um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sonda molecular, cada sonda capaz de ligar-se especificamente a uma molécula de interesse e cada sonda proporcionada com um corante em que os referidos corantes, em conjunto, permitem a transferência de energia; em que cada sonda é proporcionada com um grupo reactivo para modular a organização espacial das referidas sondas depois da ligação à molécula de interesse fazendo com que os referidos corantes fiquem a uma distância de 100 Ångstrom uns dos outros de tal modo que há uma crescente possibilidade de transferência de energia entre os corantes, e em que o referido grupo reactivo não está envolvido na ligação à molécula de interesse, e em que um grupo reactivo da referida primeira sonda não é directamente reactivo com a referida segunda sonda e requer uma substância de ligação capaz de ligar pelo menos dois grupos reactivos para mediar a transferência de energia entre os corantes nas referidas sondas.

De acordo com a invenção, uma sonda molecular é capaz de se ligar especificamente a uma molécula biológica de interesse através do seu, assim chamado, domínio de ligação. Após a ligação de pelo menos uma primeira e uma segunda sondas a uma molécula de interesse através do domínio de ligação, um grupo reactivo pode ser utilizado para modular a justaposição. Um grupo reactivo não tem qualquer tendência para competir com o domínio de ligação para ligação a uma molécula de interesse. Neste contexto, um conjunto de sondas de acordo com a invenção é distinguido de conjuntos conhecidos de sondas de

anticorpos que estão aglomerados ou justapostos pela simples ligação a uma molécula ou complexo antigénico. De preferência, um grupo reactivo permanece disponível para modular a organização espacial das sondas justapostas após a sonda ser ligada a uma molécula de interesse. A referida molécula de interesse é uma proteína, preferencialmente uma proteína de fusão, mais preferencialmente uma proteína de fusão oncogénica. A invenção proporciona um conjunto de uma primeira e uma segunda sondas moleculares, em que cada sonda é capaz de reconhecer e se ligar a um local de ligação (epítipo) posicionado em lados opostos da região de fusão da referida proteína de fusão. Naturalmente, quando se utiliza um conjunto de sondas em que cada sonda se liga a um epítipo diferente de uma molécula de interesse (por exemplo, epítipos no lado C e N-terminal da região de fusão de uma proteína de fusão), os referidos epítipos diferentes não devem interagir uns com os outros de um modo intramolecular ou intermolecular porque isso obviamente, interferiria com a ligação da sonda. Sondas diferentes num conjunto de sondas são, portanto, capazes de se ligarem a diferentes epítipos essencialmente não-interactivos. Isto é o oposto da situação descrita no documento WO 01/75453 que se refere a métodos para a detecção de uma entidade em virtude de duas sondas (repórteres), em que as duas sondas podem ligar-se ao mesmo sítio alvo na entidade, seja substancialmente simultaneamente, ou sequencialmente, ou a diferentes sítios alvo. Os repórteres/sondas do documento WO 01/75453 podem ser utilizados para detectar uma proteína de fusão quimérica. É mencionado que um repórter se liga, de preferência, a um domínio SH2 e o outro repórter se liga a um sítio de ligação SH2, isto é, as sondas do documento WO 01/75453 se ligam preferencialmente a epítipos de

interacção. Tais sondas e métodos de detecção são claramente distintos da presente invenção porque um método com base em FRET, tal como aqui proporcionado, simplesmente não funcionaria quando se utiliza um conjunto de sondas em que diferentes sondas são dirigidas contra epítomos idênticos ou de interacção. Além disso, nenhuma das sondas do documento WO 01/75453 é proporcionada com um grupo reactivo que permite a justaposição das sondas. O documento WO 02088733 revela anticorpos que se ligam a epítomos numa molécula de interesse. Cada uma dessas construções compreende um fluoróculo que permite a FRET quando postas em proximidade, bem como zíperes de leucina.

A presente invenção proporciona um kit de diagnóstico que compreende um conjunto de sondas de acordo com o descrito nas reivindicações em anexo e um método que utiliza um conjunto de sondas para detectar a presença de uma proteína de fusão de acordo com o descrito nas reivindicações em anexo. O método pode ser utilizado no diagnóstico e/ou classificação de uma doença bem como antes, durante e após o tratamento de uma doença, para avaliar a eficácia do referido tratamento.

É também descrito um método para produzir um conjunto de sondas de acordo com a invenção que compreende pôr cada sonda em contacto com um corante para formar um conjugado entre a referida sonda e o referido corante e purificar o referido conjugado, que compreende ainda pôr pelo menos uma sonda em contacto com um grupo reactivo ou um seu derivado para formar um conjugado entre a referida sonda e o referido grupo reactivo e purificar o referido conjugado.

A transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) é uma interacção dependente da distância entre os estados de excitação electrónica de duas moléculas de corante, na qual uma molécula "dadora", após excitação por uma fonte de luz, transfere a sua energia para uma molécula "aceitadora". De um modo geral, os corantes dadores e aceptadores são diferentes, caso em que a FRET pode ser detectada pelo aparecimento de fluorescência sensibilizada do aceptador ou por extinção da fluorescência do dador. Quando os corantes dadores e aceptadores são os mesmos, a FRET pode ser detectada pela despolarização da fluorescência resultante. A transferência de energia ocorre quando o espectro de emissão do aceptador se sobrepõe de forma significativa. Para conseguir a transferência de energia de ressonância, o dador deve absorver luz e transferir a mesma através da ressonância de electrões excitados para o aceptador.¹⁰⁻¹³ Geralmente, a FRET tem por base a interacção entre os corantes dadores e aceptadores que são ambos fluorescentes. No entanto, também podem ser usados corantes aceptadores não fluorescentes. Os corantes aceptadores não fluorescentes podem ser vantajosas porque eliminam a fluorescência de fundo que resulta da directa (isto é, não sensibilizada) excitação do aceptador. Na presente invenção, é possível monitorizar sondas justapostas sobre uma proteína de fusão, utilizando um corante dador fluorescente e um corante aceptador não fluorescente. A ligação específica de um conjunto de sondas às proteínas nativas, por exemplo, as proteínas A e B, dará um sinal de fluorescência basal. Após uma justaposição estreita de um conjunto de sondas numa proteína de fusão A-B, a FRET entre as sondas extinguirá a fluorescência do dador. Em vez de medir um aumento na

fluorescência do aceitador, a utilização de um aceitador não fluorescente envolve medir um decréscimo na fluorescência do dador. Num sentido mais amplo, a detecção de um sinal diminuído é menos sensível em comparação com a detecção de um sinal aumentado. Portanto, um método de acordo com a invenção é de preferência praticado utilizando um dador fluorescente e um corante aceitador fluorescente.

Para que a transferência de energia tenha lugar, o comprimento de onda de emissão de fluorescência do dador tem de ser menor do que o comprimento de onda de excitação do aceitador; isto é, o processo tem de ser "descendente" do ponto de vista energético. Uma justaposição suficientemente próxima dos dois corantes, em geral mais próxima que 100 Ångstrom, mas de preferência mais próxima que 50 Ångstrom, é essencial para a transferência de energia entre o par dador/aceitador. Um Ångstrom, uma unidade métrica de comprimento, é igual a 0,1 nanómetro ou 10^{-10} metros. A eficiência de transferência de energia por FRET é inversamente proporcional à potência de seis da distância entre o dador e o aceitador. É proporcionada a constatação que, devido a esta elevada sensibilidade à distância, a FRET é especialmente adequada para detectar a justaposição de duas sondas diferentes conjugadas com corante numa proteína de fusão.

Numa forma de realização preferida da invenção, um conjunto de sondas compreende um conjunto de pelo menos dois anticorpos conjugados com corante, cada anticorpo capaz de reconhecer um local de ligação posicionado em lados opostos da região de fusão de uma proteína de fusão. Um anticorpo adequado compreende um anticorpo convencional

(poli ou monoclonal) ou um anticorpo sintético ou um fragmento de ligação funcionalmente equivalente ao mesmo, tal como um fragmento Fab', Fab, um fragmento Fv de cadeia simples, um diacorpo (um dímero Fv de cadeia simples) e outros semelhantes. Por exemplo, uma proteína de fusão quimérica A-B pode ser detectada através de FRET pela utilização de um conjunto de sondas conjugadas com corante, por exemplo, um anticorpo anti-A e um anticorpo anti-B. Numa forma de realização preferida, a amostra é posta em contacto com dois anticorpos, um contra o domínio A e o outro contra o domínio B de uma proteína de fusão para detectar a presença de uma proteína de fusão A-B numa amostra de células. Um anticorpo é marcado com um corante dador de FRET e um outro com um corante aceitador de FRET. Apenas quando domínio A está em estreita proximidade com o domínio B, por exemplo, quando ambos são parte da mesma molécula de proteína, os dois anticorpos ficam suficientemente próximos um do outro ("justapostos"), o que permite que o par dador/aceitador induza um sinal de fluorescência detectável por FRET.

A reactividade simultânea de mais de um anticorpos diferentes com a mesma molécula de proteína necessita do reconhecimento de dois sítios diferentes de ligação ou epítomos que estão suficientemente separados a fim de evitar o impedimento estérico dos anticorpos. Por exemplo, a aplicação simultânea de um anticorpo contra os domínios variáveis (V) e um anticorpo contra os domínios constantes (C) das moléculas do receptor de células T (TCR) na superfície celular de um linfócito T não dá resultados fiáveis e reprodutíveis. No entanto, a aplicação simultânea de anticorpos de domínio V e um anticorpo contra a molécula CD3, que está estreitamente associada à

molécula do TCR, produziu excelentes resultados de coloração tanto em citometria de fluxo como microscopia.¹⁴ Estes dados sugerem que a distância entre dois epítomos na mesma proteína deve ser, de preferência, mais do que aproximadamente 80 Ångstrom para ser reconhecida simultaneamente.

Por vezes, a colocalização de dois anticorpos conjugados com corante contra partes diferentes da mesma proteína de fusão não é suficiente para a transferência de energia por FRET necessária. Um anticorpo completo é uma grande molécula de proteína em forma de Y, ~150 kDa em tamanho, constituída por 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves. Devido ao comprimento de uma molécula de anticorpo (300 a 400 Ångstrom) e a flexibilidade da região de dobradiça, as moléculas de anticorpo justapostas podem atravessar uma distância relativamente grande.¹⁵ Enquanto sondas FRET proximamente justapostas são em geral suficiente para a obtenção de um sinal de FRET, pode ser vantajoso estabilizar e/ou aumentar a justaposição de duas sondas de modo a aumentar a eficiência da FRET. Por exemplo, o tamanho de uma sonda ou de um corante pode interferir com a análise de FRET através de efeitos estéricos negativos. Além disso, a flexibilidade de um anticorpo, pode diminuir a probabilidade de ocorrência de FRET entre um par de corantes FRET que estão conjugados com sondas de anticorpo. Aquando da preparação de um conjugado de corante, como uma sonda fluorescente, em geral não é possível controlar o local de conjugação. Por exemplo, no caso de conjugação de anticorpos, a unidade corante pode ser ligada a diferentes partes da molécula do anticorpo. Dependendo do local da conjugação com corante, a orientação espacial dos corantes sobre as sondas pode ser

favorável ou desfavorável para a eficácia da transferência de energia por FRET, isto é, os corantes ligados a sondas não precisam estar necessariamente dentro da distância de transferência de energia um do outro.

Surpreendentemente, a invenção proporciona a constatação de que a justaposição de um conjunto de sondas pode ser modulada de forma a aumentar a probabilidade de transferência de energia por FRET entre um par de corantes, pelo fornecimento de pelo menos uma sonda com um grupo reactivo. A invenção proporciona um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sondas moleculares, conforme descrito nas reivindicações em anexo, cada sonda proporcionada com um corante em que os referidos corantes, em conjunto, permitem a transferência de energia; cada sonda compreendendo um grupo reactivo que permite justapor a referida pelo menos primeira e segunda sondas, em que o referido grupo reactivo permite modular a justaposição das referidas sondas de tal modo que há uma maior probabilidade de transferência de energia entre os referidos corantes. A utilização de tal conjunto de sondas permite a detecção de sondas justapostas com uma sensibilidade melhorada em comparação com a utilização de sondas que não compreendem quaisquer grupos reactivos.

No presente contexto, o termo "grupo reactivo" refere-se a uma unidade que permite modular a organização espacial dos corantes FRET por meio de uma substância de ligação capaz de ligar pelo menos dois grupos reactivos de tal modo que há um aumento na probabilidade de ocorrer a transferência de energia e/ou um aumento na eficiência de transferência de energia. A organização espacial refere-se à distância entre os corantes da organização espacial bem como à sua

orientação relativa. A modulação da organização espacial inclui ajustar e estabilizar a organização espacial dos corantes. Uma das principais condições para a ocorrência de transferência de energia é que as moléculas dadoras e receptoras têm de estar em estreita proximidade, tipicamente 10-100 Å. De acordo com a invenção, um grupo reactivo permite justapor os referidos corantes a uma distância de 100 Å um do outro, mais preferivelmente a uma distância de 50 Å um do outro, mas, ainda mais preferencialmente, a uma distância de 20 Å um do outros. É por isso preferido que um grupo reactivo seja pequeno, tal como inferior a 10 quilodaltons (kD), melhor inferior a 5 kDa, ainda melhor inferior a 2 kDa ou melhor inferior a 1 kDa. Por exemplo, um grupo reactivo é a biotina.

De acordo com a invenção, um grupo reactivo de uma primeira sonda não é directamente ou imediatamente reactivo com uma segunda sonda a fim de evitar a auto-associação das referidas sondas. Isto é vantajoso para um reconhecimento óptimo de uma proteína de fusão por cada sonda e para justapor as referidas sondas na referida proteína de fusão. Além disso, evita a ocorrência de transferência de energia extemporânea entre sondas directamente ligadas ou multimerizadas e diminui um sinal de fundo específico. Isto é importante para assegurar que um sinal de transferência de energia de facto reflecte sondas justapostas.

A invenção proporciona a constatação de que, se um grupo reactivo de uma primeira sonda não for reactivo com pelo menos uma segunda sonda a fim de evitar a auto-associação das referidas sondas, uma substância chamada substância "ponte" deve ser usada para mediar uma interacção entre as

referidas sondas, permitindo modular a justaposição das referidas sondas de tal modo que há uma possibilidade aumentada de transferência de energia entre os corantes nas referidas sondas. Uma substância pode ser qualquer tipo de composto capaz de ligar-se a uma sonda ou de modificar uma sonda, um grupo reactivo e/ou um corante para modular a organização espacial dos corantes em sondas justapostas de tal modo que seja favorável para FRET. Uma substância permite a justaposição dos referidos corantes dentro de uma distância de 2 a 100 Ångstrom uma do outra. A referida substância é adicionada a uma amostra a seguir à ligação das sondas conjugadas a corante a uma proteína de fusão alvo, numa quantidade eficaz para modular a organização espacial dos referidos corantes em sondas justapostas. Com vantagem, a referida substância liga-se a um grupo reactivo com uma alta especificidade e uma alta afinidade. Além disso, é preferido que tal substância seja relativamente pequena de modo que a substância de ligação afecte apenas de forma mínima a distância entre um par de corantes e a orientação relativa de um par de corantes. É revelado um método para detectar a presença de uma proteína de fusão numa célula pela utilização de um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sonda molecular, cada sonda capaz de reconhecer um sítio de ligação posicionado em lados opostos da região de fusão da referida proteína de fusão, cada sonda adicionalmente proporcionada com um corante em que os referidos corantes, em conjunto, permitem a transferência de energia, cada sonda proporcionada com um grupo reactivo que permite modular a justaposição da referida pelo menos primeira e referida segunda sondas de tal modo que há uma possibilidade aumentada de transferência de energia entre os referidos corantes, em que um grupo reactivo da

referida primeira sonda não é directamente reactivo com a referida segunda sonda, compreendendo proporcionar um conjunto de sondas que proporcionam uma amostra que compreende uma célula, pôr a referida amostra em contacto com as referidas sondas, em condições que permitem justapor as referidas sondas sobre a referida proteína de fusão, remover qualquer sonda não ligada ou não ligada especificamente, pôr as referidas sondas em contacto com uma substância capaz de ligar pelo menos um grupo reactivo da referida primeira sonda à referida segunda sonda e detectar a justaposição das referidas sondas por meio de FRET para determinar a presença da referida proteína de fusão.

Um método que utiliza um conjunto de sondas em que cada sonda compreende um grupo reactivo em que as sondas não interagem directamente e requerem uma substância de ligação tem várias vantagens. Em primeiro lugar, uma melhor especificidade e reduzida coloração de fundo podem ser conseguidas em comparação com um método que utiliza sondas que podem interagir directamente. Afinal de contas, para um grupo reactivo exercer o seu efeito através de uma substância de ligação, as sondas necessitam estar numa justaposição próxima uma da outra antes da adição da referida substância, isto é, que resulta da ligação de uma sonda adjacente a outra sonda na mesma proteína de fusão. Em segundo lugar, o procedimento é rápido e fácil porque não são necessárias etapas separadas de contacto/lavagem para cada sonda individual. Deste modo, a mesma permite o contacto de uma amostra com uma mistura de sondas todas juntas numa única acção. Do mesmo modo, quaisquer sondas não ligadas e não especificamente ligadas podem ser removidas simultaneamente.

Tal como aqui exemplificado na descrição pormenorizada, há um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sondas moleculares, cada sonda proporcionada com um corante em que os referidos corantes, em conjunto, permitem a transferência de energia; cada sonda é proporcionada com um grupo reactivo. Uma substância é capaz de se ligar, ou de ser "ponte", a pelo menos dois grupos reactivos. Numa forma de realização preferida, cada sonda num conjunto de sondas é proporcionada com o mesmo grupo reactivo. Além disso, cada sonda num conjunto de sondas pode ser proporcionada com um grupo reactivo diferente, porém tendo a mesma reactividade. Isto permite a utilização de um tipo de substância de ligação em ponte com pelo menos dois locais de ligação idênticos para um grupo reactivo.

Numa forma de realização preferida, é proporcionada uma sonda com mais de um grupo reactivo, o que permite que a referida sonda interaja com mais de uma molécula de substância de ligação. Proporcionar uma sonda com mais de um grupo reactivo, teoricamente aumentará a probabilidade de uma interacção entre a referida sonda e uma substância de ligação. Além disso, para a facilidade de pôr em prática a presente invenção, um grupo reactivo adequado ou um seu derivado encontra-se disponível comercialmente e pode ser fácil e eficazmente ligado a uma sonda.

De acordo com a presente invenção, um grupo reactivo particularmente interessante é a biotina, com avidina ou estreptavidina sendo uma substância de ligação particularmente adequada. A avidina é uma glicoproteína derivada da clara do ovo com um peso molecular de cerca de 68000 daltons e um diâmetro de 8 a 10 Ångstrom. Consiste

em quatro cadeias de subunidades idênticas. Uma molécula de avidina ou estreptavidina pode ligar quatro moléculas de biotina. A avidina tem uma afinidade extraordinariamente elevada (constante de afinidade 10^{15} M⁻¹) para a biotina. Esta afinidade elevada garante ao utilizador um complexo rapidamente formado e estável entre a avidina e as sondas marcadas com biotina. A proteína estreptavidina, produzida pela bactéria *Streptomyces avidinii*, tem uma estrutura muito semelhante à da avidina, e também se liga fortemente à biotina. Muitas vezes exibe uma ligação menor, não específica, e deste modo é frequentemente utilizada em vez da avidina. Uma vez formado um complexo biotina-avidina, a ligação é essencialmente irreversível. O sistema biotina-avidina é largamente utilizado e provou ser muito útil na detecção e localização de antigénios, glicoconjugados e ácidos nucleicos por meio da utilização de anticorpos biotinilados, lectinas, ou sondas de ácidos nucleicos. Como referido, um grupo reactivo com um tamanho tão pequeno é vantajoso para se conseguir uma curta distância entre um par de corantes. A biotina é uma vitamina com um peso molecular de apenas 244 daltons. Além disso, muitas moléculas de biotina podem ser acopladas a uma proteína, que permite que a proteína biotinilada se ligue a mais de uma molécula de avidina. A avidina, a estreptavidina e a biotina encontram-se disponíveis de muitas fontes comerciais. Vários procedimentos padrão para a preparação de conjugados de biotina são conhecidos dos especialistas na técnica, a maioria dos quais pode ser completada dentro de um dia. Além disso, estão disponíveis kits de biotinilação comerciais que contêm todos os componentes necessários para a biotinilação da proteína.

Se for utilizado um conjunto de sondas em que cada sonda é proporcionada com um grupo reactivo diferente, uma substância adequada compreende uma molécula capaz de se ligar a pelo menos um de cada grupo reactivo. Alternativamente, tal substância de ligação compreende um complexo de pelo menos duas moléculas que podem ser ligadas de modo covalente ou não covalente uma à outra, em que cada molécula é capaz de se ligar a um grupo reactivo.

A invenção proporciona um método para detectar uma proteína de fusão ao nível de célula única utilizando um conjunto de sondas de acordo com a invenção, cada sonda capaz de se ligar a um local de ligação posicionado em lados opostos de uma região de fusão da referida proteína de fusão através do domínio de ligação da sonda, isto é, uma sonda é dirigida contra um fragmento da proteína que compreende o fragmento N-terminal de uma proteína de fusão, e uma outra sonda é dirigida contra um fragmento de proteína que compreende o fragmento do C-terminal da mesma proteína de fusão. Uma proteína de fusão compreende qualquer tipo de substância proteínácea que é formada após a transcrição e a tradução de um gene de fusão. Um gene de fusão compreende uma parte de um ou mais genes combinada com outro gene, ou de uma parte derivada do mesmo. Uma proteína de fusão pode ser o resultado de uma translocação, inversão ou deleção cromossómica. Numa forma de realização preferida, um método proporcionado é utilizado para detectar uma proteína de fusão específica de tumores. Uma proteína de fusão pode ser uma proteína expressa de forma endógena ou pode ser o resultado da engenharia genética. As proteínas de fusão, em malignidades, que podem facilmente ser detectadas pela

utilização de um método de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitadas àsquelas listadas na Tabela I.

É de grande relevância indicar que o presente método não requer a perturbação da integridade celular, por exemplo, a preparação de um lisado celular, para detectar a presença de uma proteína de fusão intracelular. A preservação da integridade da morfologia de uma célula permite a análise ao nível de célula única, por exemplo, por citometria de fluxo, ou microscopia de fluorescência. A detecção de um sinal de FRET por citometria de fluxo oferece a possibilidade de executar uma análise rápida, multiparamétrica de células individuais específicas numa população heterogénea. A principal vantagem da citometria de fluxo é que a mesma dá directamente dados quantitativos e é muito rápida (os resultados podem ser obtidos em poucas horas).

O método proporcionado na presente invenção permite a detecção de uma proteína de fusão ao nível de célula única. Numa forma de realização preferida, o método proporcionado é utilizado para detectar uma proteína intracelular ao nível de célula única. Ao detectar uma proteína de fusão intracelular, uma amostra que compreende uma célula é tratada de modo a obter uma permeabilização do material e a preservação da morfologia. O tratamento preferido é um que fixa e preserva a integridade morfológica da matriz celular e das proteínas no interior da célula, bem como permite o mais eficiente grau de sonda, por exemplo, anticorpo, penetração.

Ao contrário, por exemplo, de um método de "captura/detecção" de anticorpo, que, essencialmente, só

pode ser aplicado para detectar a presença de uma proteína de fusão na superfície celular ou num lisado celular, o presente método permite o bloqueio do subconjunto de células que estão presentes numa mistura de células através de características imunofenotípicas. Consequentemente, o método aqui proporcionado permite a detecção de uma proteína de fusão numa população rara de células malignas num grande fundo de células normais. Isto é especialmente vantajoso para detectar baixas frequências de células de fusão positivas como no caso da detecção de uma doença residual mínima (MRD) durante ou após o tratamento para avaliação da eficácia do tratamento. Em forma de realização preferida, o método proporcionado inclui citometria de fluxo multiparamétrica para identificar e/ou isolar células individuais para detectar a presença de uma proteína de fusão ao nível de célula única. Tudo o que é necessário para pôr em prática o processo proporcionado é uma instalação de citometria de fluxo. Significativamente, o procedimento pode ser realizado em laboratórios de rotina por pessoal com perícia normal.

Foram descritos mais de uma centenas de genes de fusão diferentes e proteínas de fusão em vários tipos de cancro. Como referido, o método proporcionado permite discriminar entre a presença de proteínas normais e uma proteína de fusão aberrante ao nível de célula única. Teoricamente, dois anticorpos que reconhecem dois domínios diferentes de uma proteína de fusão podem causar uma coloração de fundo pela ligação aos domínios na proteína normal que são derivados dos genes normais em vez do gene de fusão. No entanto, em geral, apenas uma das duas proteínas normais, atinge um nível de expressão detectável numa população de

células alvo, como definido pela superfície celular e/ou marcadores intracelulares. Além disso, as proteínas normais e a proteína de fusão muitas vezes diferem no seu padrão de expressão intracelular, resultando frequentemente numa localização subcelular diferente.^{16.17} Isto implica que é improvável que colocalizações coincidentes de duas proteínas normais diferentes ocorram a um nível significativo na população de células alvo. Em particular, a justaposição coincidente de sondas suficiente para um sinal de FRET pode ser rara em células normais, se ocorrer.

É aqui proporcionado um método para produzir um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sondas moleculares conjugadas com corante FRET, de acordo com a invenção, o referido método compreendendo pôr cada sonda em contacto com um corante para formar um conjugado entre a referida sonda e o referido corante e purificar o referido conjugado, compreendendo ainda pôr cada sonda em contacto com um grupo reactivo ou um seu derivado para formar um conjugado entre a referida sonda e o referido grupo reactivo e purificar o referido conjugado. O raio Förster (R_0) é a distância que corresponde a 50% de eficiência de transferência de energia e caracteriza cada par dador/aceitador. O seu valor é, em geral, entre 30 e 60 Ångstrom. No presente contexto, o termo corante refere-se a um substituinte que, em combinação com um outro corante, pode ser utilizado para a análise de transferência de energia, nomeadamente análise de FRET. Como mencionado acima, a FRET tem em geral por base a interacção entre os corantes dador e aceitador que são ambos fluorescentes. A invenção utiliza um conjunto de sondas em que, pelo menos um dos referidos corantes é um

fluoróculo. No entanto, um aceitador não fluorescente também pode ser utilizado e a FRET é detectada pela extinção da fluorescência do dador. Como referido, a detecção de FRET por monitorização de uma diminuição na fluorescência do dador como uma consequência de sondas justapostas, muitas vezes, não é tão sensível como a detecção de um aumento na fluorescência do aceitador. Assim, numa forma de realização preferida, pelo menos duas sondas marcadas por fluorescência são utilizadas para a detecção de uma proteína de fusão, tal como é exemplificado na descrição pormenorizada. Exemplos de fluoróculos preferidos são aqueles adequados para análise por citometria de fluxo convencional, e incluem marcadores de fluoresceína, por exemplo, 5-(e 6)-carboxifluoresceína, 5- ou 6- carboxifluoresceína, ácido hexanóico de 6-(fluoresceína)-5-(e 6)-carboxamida e isotiocianato de fluoresceína, corantes Alexa Fluor tais como Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594, corantes de cianina tal como Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, cumarina opcionalmente substituída, R-ficoeritrina, aloficoeritrina, o Texas Red e Princeton Red bem como de conjugados com R-ficoeritrina e, por exemplo, Cy5 ou Texas Red e membros das ficobiliproteínas. Outros corantes de interesse são corantes de pontos quânticos, que vêm numa paleta de cores quase ilimitada. Informações adicionais sobre os pares dador/aceitador adequados para a detecção de transferência de energia por citometria de fluxo podem ser encontradas em Szollosi et al.¹⁸ As combinações preferidas de fluoróculos compreendem os corantes utilizados nos conjugados clássicos em tandem, também referidos como duoculos ¹⁹.

O método proporcionado compreende proporcionar uma amostra que compreende uma célula, em que a referida amostra é

opcionalmente submetida a fixação e a permeabilização se uma proteína de fusão de intracelular é para ser detectada. Uma amostra pode compreender uma célula primária que é obtida a partir de uma amostra biológica. Uma amostra biológica pode ser uma amostra de fluido corporal que inclui sangue, soro, urina, medula óssea, fluido cefalorraquidiano (FCS), saliva. Pode também ser uma amostra de tecido, tecido homogeneizado. Uma amostra compreende uma célula cultivada que pode ser uma célula primária cultivada, por exemplo, células tumorais obtidas a partir de uma biópsia de módulos linfáticos. Além disso, a amostra pode compreender uma célula cultivada a partir de uma linhagem celular estabelecida em laboratório, tal como uma linhagem celular K562, KASUMI-1, REH ou CEM que pode ser obtida a partir de várias fontes tais como a American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org para um catálogo on-line). O método proporcionado é adequado para detectar a presença de uma proteína de fusão endógena, bem como uma proteína de fusão recombinante numa célula.

Para a análise de uma amostra que compreende uma suspensão de células, é preferido que a amostra seja tratada de modo a se obter uma preservação da morfologia do material e permeabilização a fim de assegurar uma acessibilidade suficiente de uma molécula de interesse a uma sonda. O tipo de tratamento dependerá de vários factores, por exemplo, do fixador utilizado, do grau de fixação e do tipo e propriedades da molécula de interesse. A fixação pode ser levada a cabo com um fixador, tal como formaldeído.

Para a detecção de uma proteína de fusão em células primárias, é especialmente vantajoso utilizar um marcador adicional para definir uma população de células alvo de interesse. Inúmeras aplicações biológicas importantes em doenças infecciosas, detecção e monitorização de MRD, e terapia genética, tipicamente requerem a análise e o isolamento de células raras (por exemplo, células estaminais hematopoiéticas/progenitoras) a partir de uma grande procedência. Numa forma de realização da invenção, o método inclui a coloração de uma amostra por pelo menos, um marcador celular, tal como um marcador de superfície celular ou um marcador intracelular, para definir uma população de células alvo numa mistura de células, compreendendo pôr a referida amostra em contacto com um composto capaz de ligar-se selectivamente ao referido marcador. Numa forma de realização preferida, tal composto é directamente marcado com um corante fluorescente. Um composto adequado compreende um anticorpo marcado fluorescentemente ou um fragmento de ligação funcionalmente equivalente ao mesmo. Além disso, pode ser utilizado um composto capaz de ligar-se selectivamente a um marcador celular que pode ser detectado pela utilização de um reagente secundário conjugado com corante (por exemplo, um anticorpo secundário marcado fluorescentemente). Um marcador celular compreende qualquer tipo de marcador intracelular ou ligado à membrana que pode ser utilizado para distinguir uma subpopulação de células numa mistura de células. Uma mistura de células compreende células vivas. Compreende também células permeabilizadas e/ou fixadas. Um marcador celular pode ser um agrupamento de antigénios de diferenciação (CD). Os marcadores CD são moléculas de superfície celular de células hematopoiéticas, entre

outras, que são distinguíveis com anticorpos monoclonais. As células hematopoiéticas compreendem os tímócitos, células dendríticas, células de Langerhans, neutrófilos, eosinófilos, células B do centro germinativo, células dendríticas foliculares, células de plasma e células da medula óssea. Por exemplo, os marcadores celulares adequados compreendem CD1, CD3, CD4, CD8, CD10, CD19, CD20, CD33, CD34 e CD117. Os anticorpos monoclonais dirigidos contra um grande número de marcadores CD humanos podem ser obtidos de vários fornecedores, tais como BD Biosciences ou Ancell Immunology Research Products, Bayport, EUA. Muitas vezes, encontram-se disponíveis anticorpos que são conjugados directamente com um fluoróculo de eleição, por exemplo, CD10-PE ou CD19-FITC, o que é, obviamente, uma escolha preferida para a prática de um método de acordo com a invenção.

Na presente revelação, é descrito um método para identificar e/ou isolar células únicas raras utilizando técnicas de citometria de fluxo multiparamétrica/selecção de células e para melhor caracterizar estas células pela presença ou ausência de uma proteína de fusão de interesse. Tal método é particularmente adequado para aplicação a vários problemas importantes no desenvolvimento do sistema imunitário, doenças infecciosas, cancro e terapia génica. Tipicamente, antes da coloração de uma amostra de células com um conjunto de sondas, as células são marcadas com pelo menos um anticorpo relevante conjugado com corante de acordo com procedimentos padrão a fim de definir uma população de células alvo. A escolha do corante deve, de preferência, mas não exclusivamente, ter como objectivo a utilização de dois ou três corantes para imunofenotipagem para além dos

corantes de FRET para a detecção de uma proteína de fusão. Por exemplo, um conjunto de sondas de FRET de acordo com a invenção pode ser combinado com outro corante para mediar o bloqueio do subconjunto de leucócitos através de características imunofenotípicas, por exemplo, CD10, CD19 e CD20 para definir de forma precisa os subconjuntos de células B precursoras na medula óssea, ou CD1, CD4 e CD8 para definir subconjuntos de timócitos, ou CD34 e/ou CD117 para identificar populações de células estaminais/precursoras. Como é aqui apresentado na descrição pormenorizada, a invenção proporciona um método que permite a detecção de uma proteína de fusão intracelular num subconjunto de células muito pequeno, isto é, a detecção de MRD, que é essencial para avaliar a eficácia do tratamento do cancro.

A invenção proporciona um kit de teste para diagnóstico para detectar a presença de uma proteína de fusão numa célula, que compreende um conjunto de sondas de acordo com a invenção. Por exemplo, tal kit pode ser utilizado para monitorização e quantificação de células malignas, por exemplo, células leucémicas, por meio da detecção de células positivas para proteína de fusão específicas de tumor. O kit de teste para diagnóstico aqui proporcionado é útil na altura do diagnóstico bem como durante e depois do tratamento para avaliar a eficácia do protocolo de tratamento aplicado ao cancro.

Tabela I. Exemplos de proteínas de fusão em malignidades que podem ser detectadas por meio de tecnologia FRET mediada por anticorpo

Malignidades	Aberrações cromossômicas	Proteína de fusão
Precursoras-B-ALL	t(1;19) (q23;p13)	E2A-PBX1
	t(4;11) (q21;q23)	MLL-AF4
	t(9;22) (q34;q11)	BCR-ABL
	t(12;21) (p13;q22)	TEL-AML1
Leucemia mieloide aguda	t(8;21) (q22;q22)	AML1-ETO
	t(15;17) (q22;q21)	PML-RARA
	inv(16) (p13;q22)	CBFB-MYH11
Linfoma	t(2;5) (p23;q35)	NPM-ALK
Sarcoma de Ewing	t(11;12) (q24;q12)	EWS-FLI1

Legendas das Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de um gene de fusão que consiste na parte a montante (5') do gene A e parte a jusante (3') do gene B. Este gene de fusão A-B é transcrito em ARNm A-B e traduzido numa proteína de fusão A-B.

Figura 2. Diagrama esquemático do princípio de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) com o fluoróforo X como o corante dador e Y como o corante aceitador. **A.** O corante aceitador Y não será excitado pela emissão de luz do corante dador X, se a distância entre X e Y for demasiado grande. **B.** Se a distância entre o corante dador e o aceitador for suficientemente pequena (<80 Ångstrom, mas de preferência

50 Ångstrom), a emissão de luz do corante dador X excitará o corante aceitador Y.

Figura 3. Diagrama esquemático da proteína de fusão A-B reconhecida por um conjunto de sondas de anticorpo anti-A e anti-B. **A.** A Sonda A é conjugada com o corante dador X e a sonda B é conjugada com o corante aceitador Y (ver Figura 2). Além disso, ambas as sondas são conjugadas com biotina como grupo reactivo. **B.** Depois da incubação com as sondas de anticorpo A e B, as sondas podem ser ligadas umas às outras através de incubação com avidina, desde que as duas sondas de facto reconheçam e se liguem à mesma proteína de fusão A-B. Esta justaposição dos dois anticorpos (estabilizada pelo sistema biotina-avidina) é detectável através do princípio de FRET (ver Figura 2).

Figura 4. Exemplo de detecção mediada por FRET da proteína de fusão TEL-AML1 em células ALL. **A.** Células precursoras B-ALL no diagnóstico. Bloqueio por citometria de fluxo em blastos ALL como definido por características de dispersão de luz (*esquerda*), seguido por bloqueio em blastos CD19⁺ (*meio*), e a avaliação da presença da proteína de fusão TEL-AML1 no interior das células ALL CD10⁺/CD19⁺ (*direita*). **B.** Células precursoras B-ALL durante o acompanhamento. Detecção por citometria de fluxo de baixas frequências de células TEL-AML1 positivas (doença residual mínima) durante o acompanhamento para avaliação da eficácia do tratamento. Apenas 3% dos blastos CD10⁺ foram positivos para a proteína de fusão TEL-AML1, isto é, apenas 0,2% do total de leucócitos.

Descrição Pormenorizada

Tal como mencionado acima, a presente invenção refere-se a um método para determinar a presença de uma proteína de fusão numa célula por meio da utilização de um conjunto de sondas. Este método pode ser utilizado para diagnosticar vários tipos de cancro, que envolvem translocações, inversões ou deleções cromossómicas, que dão origem a um gene de fusão. Por exemplo, aproximadamente 35% de doentes adultos com leucemia linfoblástica aguda (ALL), e leucemia mielóide crónica (CML) estão associados com um defeito cromossómico específico, uma translocação entre os cromossomas 9 e 22 que cria o cromossoma Filadélfia (Ph). Esta translocação ocorre no local no genoma de uma proteína tirosina quinase denominada ABL, que cria a proteína de fusão BCR-ABL anormal, um produto génico da fusão *in-frame* do gene ABL com outro gene designado BCR. De um modo geral, as proteínas de fusão desempenham um papel importante no processo oncogenético. Por exemplo, a actividade quinase de ABK na proteína de fusão BCR-ABL é activada e desregulada, conduzindo a um crescimento celular descontrolado observado em ALL e CML. Quando é diagnosticada a leucemia linfoblástica aguda num doente, compreendendo tipicamente exames citogenéticos tradicionais tais como a análise de cariótipos para o cromossoma Ph, o número total de células de leucemia é aproximado para 10^{11} a 10^{13} . Uma maioria dos doentes atinge remissão completa após cerca de 5 semanas de quimioterapia. A remissão completa não significa que as células leucémicas estejam totalmente erradicadas do corpo mas que o seu nível está além dos nível de sensibilidade dos métodos citomorfológicos clássicos (por exemplo, 1 a 5%). Nessa altura, até 10^{10} células malignas podem ainda permanecer no doente. Elas representam a doença residual mínima (MRD). A detecção de baixas frequências de células

malignas residuais permite um acompanhamento mais prolongado da carga tumoral durante a quimioterapia e, deste modo, permite apreciar melhor a sensibilidade das células de leucemia ao tratamento. É agora estabelecido que o nível de MRD representa um poderoso factor de prognóstico para o resultado final. Além disso, a detecção de um aumento do nível de MRD permite antecipar a reincidência iminente. O método proporcionado na presente invenção permite discriminar entre a presença de proteínas normais e uma forma aberrante de proteína de fusão ao nível de célula única.

Como exemplo deste método, descreveremos a preparação de um conjunto de sondas para a detecção da proteína de fusão TEL-AML1. É também descrito um método que utiliza este conjunto de sondas, para detectar a presença da proteína de fusão TEL-AML1 em células ALL na altura do diagnóstico e durante o acompanhamento para detectar o nível de MRD.

Exemplo

Preparação de um Conjunto de Sondas

Preferencialmente, um conjunto de sondas de acordo com a invenção compreende um conjunto de dois anticorpos conjugados com fluoróculo cada anticorpo adicionalmente proporcionado com um grupo reactivo. Os métodos de produção de um anticorpo são conhecidos dos especialistas na técnica. Por exemplo, para se obter um anticorpo policlonal, um animal de laboratório é imunizado com um imunogénio, tal como uma proteína recombinante ou um péptido sintético. A resposta imune do animal é monitorizada através da colheita de amostras de sangue para teste e determinação do título da reactividade. Quando são obtidos títulos apropriadamente elevados, o

sangue é colhido do animal e anti-soros são preparados. Se desejado, pode ser feito o fraccionamento adicional dos anti-soros para enriquecer com anticorpos reactivos à proteína. Ver, por exemplo, Harlow et al. *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nova Iorque (1988). Os anticorpos monoclonais podem ser obtidos por meio de vários métodos conhecidas na técnica, por exemplo por fusão de células do baço de murganhos imunizados com uma linhagem celular de mieloma pela adição de polietileno glicol (PEG). As células fundidas são cultivadas num meio de selecção, por exemplo, um meio que contém uma mistura de hipoxantina, aminopterina e timidina. As células fundidas que sobrevivem neste meio de selecção são testadas quanto à produção do anticorpo desejado (frequentemente por imunoensaio de fase sólida, tal como ELISA) e, se o resultado for positivo, as culturas são clonadas, de modo que haja apenas uma célula em cada poço de cultura. Isto produz um clone de células a partir de uma única progenitora que é imortal e produtora de anticorpo monoclonal. Os anticorpos obtidos podem ser caracterizados utilizando técnicas convencionais de imunodiagnóstico, por exemplo, por Western blotting utilizando lisados de células que expressam uma proteína de fusão recombinante ou por ELISA.

Biotinilação de anticorpos

A biotina é tipicamente conjugada a proteínas por meio de aminas primárias (isto é, lisinas). De um modo geral, entre 3 e 6 moléculas de biotina são conjugadas para cada anticorpo. Dialisar ou trocar numa coluna o anticorpo em carbonato 100 mM, pH 8,4. Medir a concentração de anticorpo após equilíbrio em tampão. (Para IgG, 1 mg/mL tem um A_{280} de 1,4). Se a concentração de anticorpo for

inferior a 1 mg/mL, a conjugação provavelmente será sub-ótima. Se necessário, diluir o anticorpo a uma concentração de 4 mg/mL. Dissolver 10 mg de biotina (N-hidroxisuccinimidobiotina, Pierce) em 1 mL de DMSO anidro (dimetil sulfóxido anidro, Aldrich), imediatamente antes da utilização. A molécula de biotina reactiva é instável. Uma vez que a biotina é solubilizada, deve ser utilizada imediatamente. Adicionar biotina para dar uma proporção de 80 µg por mg de anticorpo; misturar imediatamente. Enrolar o tubo em folha metálica; incubar e centrifugar à temperatura ambiente durante 2 horas. Remover a biotina que não reagiu e trocar o anticorpo em Tris 10 mM pH 8,2, NaCl 150 mM, pHix (5 mg/mL de pentaclorofenol em etanol a 95% (utilização como 10.000x, ou 3-4 gotas por litro) Sigma).

Conjugação de um Anticorpo com FITC

FITC é uma molécula orgânica pequena, e é tipicamente, conjugada a proteínas por meio de aminas primárias (isto é, lisinas) de uma imunoglobulina. De um modo geral, entre 3 e 6 moléculas de FITC são conjugadas para cada anticorpo; conjugações mais elevadas podem resultar em problemas de solubilidade, bem como desactivação interna (e brilho reduzido). Deste modo, um anticorpo normalmente será conjugado em várias reacções paralelas para diferentes quantidades de FITC, e os reagentes resultantes serão comparados quanto ao brilho (e adesividade de fundo) para escolher a melhor proporção de conjugação. Toda a conjugação pode ser realizada em cerca de meio dia. A molécula reactiva fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, é instável. Uma vez que um frasco tenha sido quebrado e o FITC solubilizado, o mesmo deve ser utilizado imediatamente. Uma vez que frascos individuais de FITC

contêm material suficiente para ~100 mg de anticorpo, é económico realizar conjugações múltiplas de FITC no mesmo dia.

1. Preparação de Anticorpo

Dialisar ou trocar numa coluna o anticorpo em carbonato 500 mM, pH 9,5. Medir a concentração de anticorpo após equilíbrio em tampão. (Para IgG, 1 mg/mL tem um A_{280} de 1,4). Se a concentração de anticorpo for inferior a 1 mg/mL, a conjugação provavelmente será sub-ótima. Se necessário, diluir o anticorpo a uma concentração de 4 mg/mL.

2. Conjugação Covalente

Dissolver 10 mg (todo o conteúdo de 1 frasco; não há necessidade de pesar) de FITC (Molecular Probes) em DMSO anidro imediatamente antes da utilização. Adicionar FITC para dar uma proporção de 40-80 µg por mg de anticorpo; misturar imediatamente. Envolver o tubo em folha metálica; incubar e centrifugar à temperatura ambiente durante 1 hora. Remover o FITC que não reagiu e trocar o anticorpo em carbonato 500 mM, pH 9,5 por filtração em gel ou diálise.

3. Caracterização do conjugado

Determinar F/P e a concentração de proteína por medição da absorvância a 280 e 495 nm. IgG: 1 mg/mL tem um $A(280)$ de 1,4; peso molecular = 150.000. IgM: 1 mg/mL tem um $A(280)$ de 1,2; peso molecular = 900.000. Fluoresceína: 1 mM tem um $A(495)$ de 68 e um $A(280)$ de 11,8. Valores de F/P de 3-10 são provavelmente óptimos para qualquer IgG particular. Concentração de proteína: IgG (mg/mL) = $[A(280) - 0,31 * A(495)] / 1,4$.

$$\text{IgM (mg/mL)} = [A(280) - 0,31 * A(495)] / 1,2$$

Proporção de F/P:

$$\text{IgG: } 3,1 \cdot A(495) / [A(280) - 0,31 \cdot A(495)]$$

$$\text{IgM: } 15,9 \cdot A(495) / [A(280) - 0,31 \cdot A(495)]$$

Detecção por análise de FRET

Uma amostra de medula óssea é obtida de um doente com ALL e os leucócitos são isoladas de acordo com procedimentos padrão. Os leucócitos são marcados com dois marcadores de superfície celular para definir um subconjunto de leucócitos por meio de características imunofenotípicas. Foram utilizados CD19(FITC-CD19) monoclonal anti-humano conjugado com FITC e CD10(PE-CD10) monoclonal anti-humano conjugado com PE. As células são então fixadas de acordo com procedimentos padrão, por exemplo em 1% de paraformaldeído, para preservar a integridade da célula e o seu conteúdo. A membrana da célula é permeabilizada usando um detergente, tal como saponina para fazer o interior da célula acessível ao conjunto de sondas. As células são marcadas durante 1 hora a 4 graus Célsius no escuro com uma mistura que contém um conjunto de sondas de acordo com a invenção (0,1 a 0,3 microgramas/mL de cada sonda), compreendendo um anticorpo conjugado com biotina marcada com Cy3 contra o motivo hélice-loop-hélice de TEL e um anticorpo conjugado com biotina marcada com Cy5 contra o domínio Runt de AML1. Após a lavagem das células para remover as sondas não ligadas, as células são incubadas com avidina não marcada para induzir uma justaposição suficientemente próxima e estável dos dois anticorpos diferentes. As células são depois analisadas num citómetro de fluxo. Os resultados estão apresentados na Figura 4. O painel A apresenta a avaliação da proteína de fusão TEL-AML1 em células precursoras-B-ALL obtidas de um doente na altura do diagnóstico. Os blastos ALL são

primeiro bloqueados com base nas suas características de dispersão de luz (dispersão para frente versus dispersão lateral. Depois, os blastos CD19 positivos são bloqueados (FL1 versus dispersão lateral). A presença da proteína de fusão TEL-AML1 é facilmente detectável no subconjunto de células CD19+/CD10+ALL. No painel B, são apresentadas análises semelhantes do mesmo doente após um protocolo de terapia de cinco semanas para avaliar a eficácia do tratamento. Apenas 3% dos blastos CD10+ são positivos para a proteína de fusão TEL-AML1, isto é, apenas 0,2% do total de leucócitos. A detecção de tal baixa frequência de células positivas TEL-AML1 (doença residual mínima) não foi apresentada anteriormente.

Utilizamos o FacsCalibur para realizar medições de FRET utilizando Cy3 e Cy5 como o par dador/aceitador. A excitação de 488 nm não é ótima para Cy3 (543 seria melhor), 632 é ótima para Cy5, e com esta montagem se pode obter curvas de distribuição de FRET razoavelmente boas (na realidade, elas são melhores do que aquelas obtidas com o par FITC/TRITC porque a autofluorescência é um problema muito menor). Além disso, poderíamos utilizar a banda 488->520 para correcção da autofluorescência com base em célula por célula. A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando o software Cell Quest Pro.

Referências

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds), *World Health Organization classification of tumors. Pathology and Genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: Iarc Press, 2001.
2. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, et al, *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts*

from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.

3. Rabbitts TH, Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-9.

4. Look AT, Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-64.

5. Crans HN, Sakamoto KM, Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15 : 313-31.

6. Van Denderen J, Hermans A, Meeuwssen T, et al, Antibody recognition of the tumor-specific bcr-abl joining region in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med* 1989; 169: 87-98.

7. Van Denderen J, ten Hacken P, Berendes P, et al, Antibody recognition of the tumor-specific b3-a2 junction of bcr-abl chimeric proteins in Philadelphia-chromosome-positive leukemias. *Leukemia* 1992; 6: 1107-12.

8. Sang BC, Shi L, Dias P, et al, Monoclonal antibodies specific to the acute lymphoblastic leukemia t (1; 19)-associated E2A/PBX1 chimeric protein: characterization and diagnostic utility. *Blood* 1997; 89: 2909-14.

9. Berendes P, Recognition of tumor-specific proteins in human cancer, Ph. D. Thesis, Chapter 8. Rotterdam: Erasmus University Rotterdam, 1997: 111- 27.

10. www.probes.com/handbook/tables/1570.html

11. Matyus L, Fluorescence resonance energy transfer measurements on cell surfaces. A spectroscopic tool for determining protein interactions. *J Photochem Photobiol B* 1992; 12: 323-37.

12. Broudy VC, Lin NL, Buhring HJ, et al, *Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer*. *Blood* 1998; 91: 898-906.
13. Chan FK, Siegel RM, Zacharias D, et al, *Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein*. *Cytometry* 2001; 44: 361- 8.
14. Van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, Hooijkaas H, van Dongen JJM. *Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls*. *Cytometry* 2000; 40: 336-345.
15. I. Roitt. *Essential Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2001; 37-58.
16. Falini B, Flenghi L, Fagioli M, et al, *Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal antibody PG-M3 (anti-PML)*. *Blood* 1997; 90: 4046-53.
17. Falini B, Mason DY, *Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry*. *Blood* 2002; 99: 409-26.
18. Szollosi J, Damjanovich S, Matyus L, *Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: Routine and research*. *Cytometry* 1998; 34: 159-179.
19. Tanke, HJ. *Fluorochromen voor twee-en drievoudige labelingen. Immunofenotypering in de diagnostiek: indicatiestellingen, uitvoering en interpretatie*. Eds. Van Dongen, Groeneveld, Adriaansen, Hooijkaas (ISBN 90-73436-16-8). 1994; páginas 55-61.

REIVINDICAÇÕES

1. Conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sondas FRET para a detecção de uma proteína de fusão cuja proteína de fusão compreende um primeiro local alvo posicionado em lados opostos da região de fusão da referida proteína de fusão, **caracterizado pelo fato de:**

- a) a primeira sonda (i) compreender um domínio que se liga especificamente ao primeiro local alvo da proteína de fusão, (ii) ser proporcionada com pelo menos um primeiro grupo reactivo e (iii) ser proporcionada com um primeiro corante FRET;
- b) a segunda sonda (i) compreender um domínio que se liga especificamente a um segundo alvo da proteína de fusão, (ii) ser proporcionada com pelo menos um segundo grupo reactivo e (iii) ser proporcionada com um segundo corante FRET;

em que

- c) para evitar a auto associação das sondas, os grupos reactivos na primeira sonda não interagem directamente com a segunda sonda, e os grupos reactivos na segunda sonda não interagem directamente com a primeira sonda;
- d) as duas sondas não interagem uma com a outra excepto se for adicionada uma substância de ligação que reage com o primeiro e o segundo grupos reactivos;
- e) depois da adição da substância de ligação, os corantes FRET são postos a uma distância de 100 Ångstrom um do outro, deste modo permitindo a transferência de energia e a detecção de sondas justapostas.

2. Conjunto de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma sonda é proporcionada com uma multiplicidade de grupos reactivos.

3. Conjunto de acordo com as reivindicações 1 ou 2 em que a referida sonda é um anticorpo ou um fragmento de ligação funcionalmente equivalente ao mesmo.

4. Conjunto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que pelo menos um dos referidos corantes é um fluoróculo.

5. Conjunto de acordo com a reivindicação 4, em que o referido fluoróculo é seleccionado do grupo que consiste em isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), Texas Red (TR), R-ficoeritrina (R-PE), aloficocianina (APC), membros das ficobiliproteínas, Cy3, Cy5, Cy5,5, Cy7, corantes de cianina, corantes Alexa Fluor, conjugados em tandem desses fluoróculos e corantes de pontos quânticos.

6. Conjunto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o referido grupo reactivo compreende biotina.

7. Conjunto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a substância de ligação compreende avidina ou estreptavidina.

8. Kit para diagnóstico para a detecção de proteínas de fusão numa célula que compreende um conjunto de sondas de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Método *in vitro* para a detecção da presença de uma proteína de fusão numa célula, em que a proteína de fusão compreende um primeiro local alvo e um segundo local alvo posicionados em lados opostos da região de fusão da referida proteína de fusão, o referido método compreendendo:

- (i) pôr uma amostra que compreende uma célula em contacto com um conjunto de pelo menos uma primeira e uma segunda sondas FRET de acordo com as reivindicações 1 a 8, em condições que permitem a ligação das referidas sondas à referida proteína de fusão
- (ii) adicionar a substância de ligação; e
- (iii) detectar a justaposição das referidas sondas por meio de FRET.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, que inclui adicionalmente a etapa de corar a referida amostra para pelo menos um marcador celular definir uma população de células alvo, o método compreendendo pôr a referida amostra em contacto com um composto capaz de selectivamente ligar-se ao referido marcador celular.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o referido marcador celular é um agrupamento de antigénios de diferenciação (CD).

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, em que a referida proteína de fusão é uma proteína de fusão específica de tumor.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, em que o sinal FRET é detectado por citometria de fluxo, deste modo permitindo a detecção ao nível de célula única.

Lisboa, 29 de Novembro de 2010

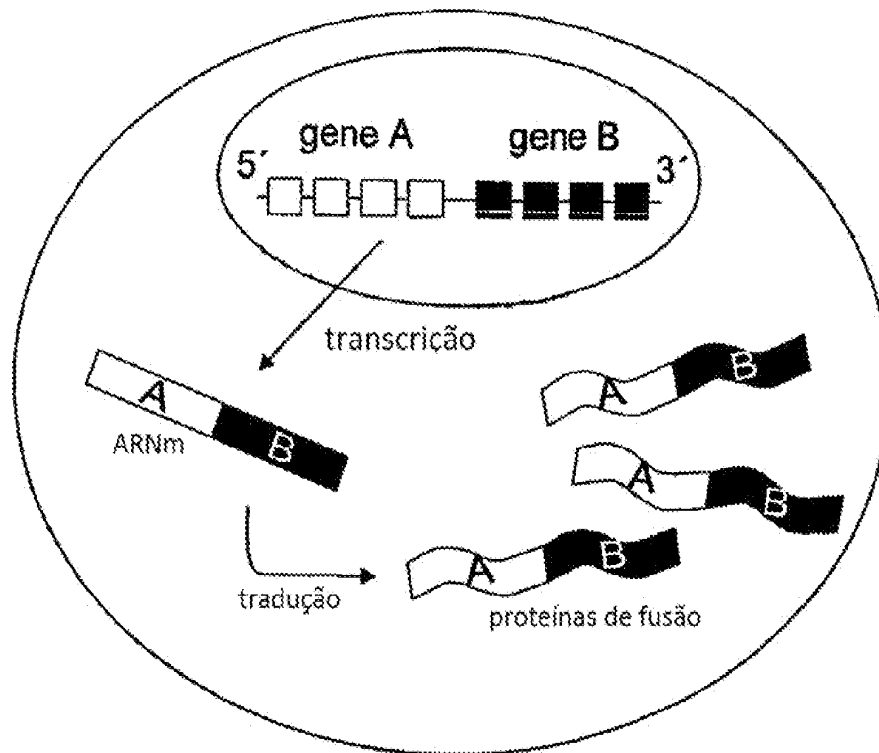


Figura 1

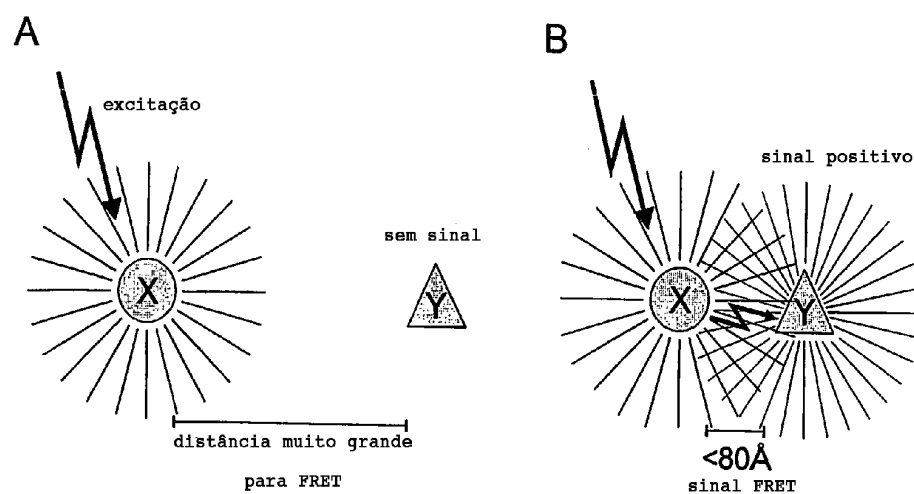


Figura 2

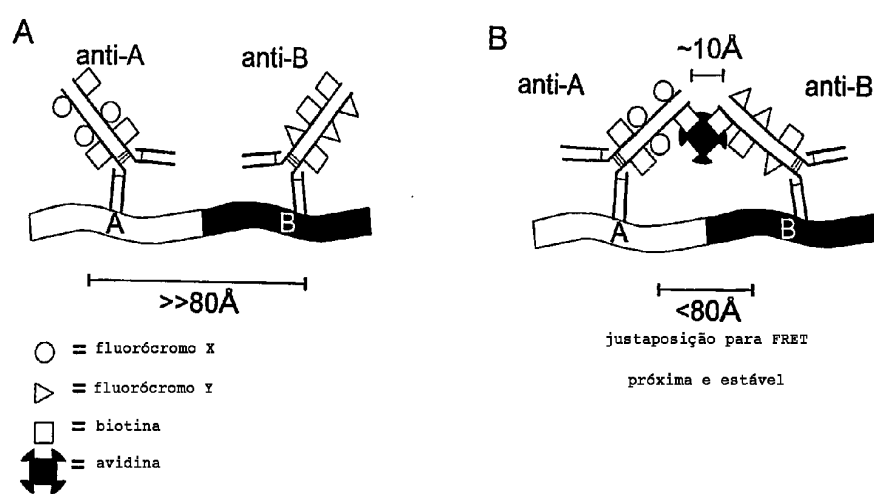
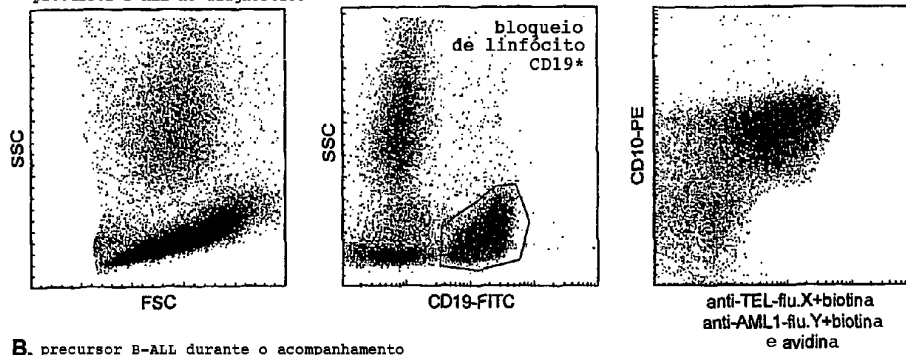


Figura 3

A. precursor B-ALL no diagnóstico



B. precursor B-ALL durante o acompanhamento

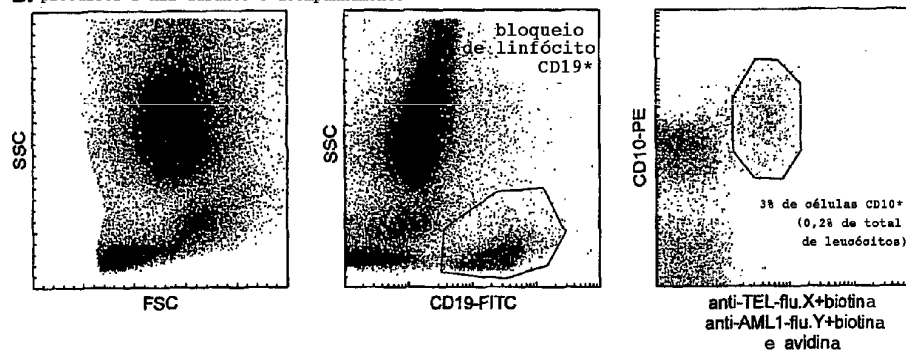


Figura 4