



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 050**

51 Int. Cl.:
G01N 33/542 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03772958 .9**
96 Fecha de presentación : **06.11.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1565746**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54 Título: **Método y sondas para la detección de una proteína de fusión específica de un tumor.**

30 Prioridad: **07.11.2002 EP 02079666**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.03.2011

73 Titular/es: **Erasmus Universiteit Rotterdam**
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL

72 Inventor/es:
Van Dongen, Jacobus, Johannes, Maria

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 352 050 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y sondas para la detección de una proteína de fusión específica de un tumor.

Esta invención se refiere a la detección de, entre otras, proteínas de fusión específicas de un tumor. Más específicamente, la invención se refiere a técnicas que indican la presencia de translocaciones cromosómicas detectando la presencia de una proteína de fusión a nivel de una sola célula. En el diagnóstico de diversos tipos de cáncer, tales como leucemias, linfomas y tumores sólidos, las aberraciones cromosómicas se usan frecuentemente para la clasificación en subgrupos relevantes desde el punto de vista del pronóstico¹. Muchas de estas aberraciones cromosómicas dan como resultado genes de fusión, es decir, genes acoplados aberrantemente acoplados vía la parte en dirección de un gen a la parte en dirección del otro gen, o viceversa. Los genes de fusión se pueden transcribir en transcritos de genes de fusión, y se pueden traducir en proteínas de fusión. Generalmente, las proteínas de fusión desempeñan un papel importante en el proceso oncogénico. Hasta ahora, se ha descrito más de un centenar de diferentes genes de fusión y proteínas de fusión en diversos tipos de cáncer²⁻⁵.

El término "cáncer" comprende un grupo heterogéneo de neoplasmas, en el que cada tipo tiene sus propias características cuando se considera su potencial neoplásico y su respuesta a terapia. No es necesario decir que el diagnóstico y clasificación exactos de los diversos tipos de cáncer es preeminente a la hora de ayudar a seleccionar la terapia más eficaz. Además, es esencial un método de diagnóstico que permita la detección de pequeños números de células neoplásicas en un gran escenario de células normales durante terapia, para evaluar la eficacia del tratamiento y para anticipar una recaída inminente.

Las translocaciones cromosómicas se pueden detectar mediante un amplio conjunto de técnicas, la mayoría de las cuales implican tecnología biomolecular moderna. Las técnicas citogenéticas incluyen técnicas de bandedo cromosómico convencionales (cariotipado) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) que usa sondas marcadas fluorescentemente. Para detectar fusiones de puntos de ruptura cromosómica, como se puede encontrar en translocaciones, inversiones y supresiones cromosómicas, se pueden usar estrategias a base de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores localizados en cada lado del punto de ruptura. La amplificación de ADN sólo se puede usar para aberraciones cromosómicas en las que los puntos de ruptura se agrupan en un área pequeña. En la mayoría de los casos, los puntos de ruptura se extienden sobre grandes regiones intrónicas, pero varias translocaciones, inversiones y supresiones dan lugar a genes de fusión y a transcritos de fusión adecuados para la amplificación mediante PCR después de una etapa de transcripción inversa (RT-PCR).

Las técnicas más usadas habitualmente dirigidas a detectar aberraciones cromosómicas específicas implican el análisis a nivel cromosómico o de ácidos nucleicos (ADN o ARN). Una ventaja de tales marcadores de fusión genética es su implicación directa en la oncogénesis. En consecuencia, su presencia es constante a lo largo de toda la evolución de la enfermedad. Sin embargo, un inconveniente principal de los marcadores de fusión se refiere al hecho de que no se pueden excluir variaciones en el nivel de la transcripción génica y/o traducción génica durante una enfermedad, y particularmente durante la terapia. De este modo, variaciones en la expresión de un transcrito de un gen de fusión o en la expresión de una proteína de fusión hacen difícil correlacionar el nivel de detección del marcador con la cantidad de células neoplásicas. Esto implica que la detección de un producto génico de fusión se lleva a cabo preferiblemente a nivel proteico en células individuales.

Una proteína de fusión comprende partes de al menos dos proteínas que corresponden a y que se transcribieron originalmente por y se tradujeron a partir de los genes separados originalmente. Las proteínas de fusión se caracterizan de forma única por un punto de fusión, en el que se encuentran las dos proteínas. Los puntos de fusión están a menudo expuestos antigénicamente, comprendiendo distintos epítomos que algunas veces se pueden detectar inmunológicamente.

Inicialmente, se hicieron intentos para crear anticuerpos específicos contra proteínas de fusión generando anticuerpos frente a un péptido que corresponde a la región de unión de una proteína de fusión. Este enfoque ha tenido raramente éxito, principalmente debido al hecho de que es difícil encontrar reactivos inmunológicos que sean exclusivamente reactivos con una proteína de fusión y no con las proteínas sin fusionar que normalmente se producen en una célula. Si se obtenían anticuerpos específicos de la fusión, generalmente no eran aplicables a microscopía de fluorescencia o citometría de flujo⁶⁻⁸. Por ejemplo, el anticuerpo ERP-FP1 frente a la proteína de fusión BCR-ABL funciona bien en procedimientos de transferencia Western, pero no tiene éxito en estudios microscópicos sobre leucemias positivas a BCR-ABL humanas^{6,7}. Además, considerando la gran variación dentro de reordenamientos individuales observados en translocaciones cromosómicas, y dependiendo de la localización del punto de ruptura en el gen no aberrante, en el que (incluso cuando se producen las translocaciones dentro de los mismos dos genes) se pueden generar diferentes proteínas de fusión, se considera probable que, dentro de cada caso separado de proteínas de fusión, surjan nuevos puntos de fusión. La detección de proteínas de fusión mediante detección inmunológica específica del epítomo del punto de fusión de la proteína de fusión nunca ha sido por lo tanto ampliamente aplicable.

Un método alternativo para la detección específica de proteínas de fusión implica la aplicación de un denominado anticuerpo de captura, que reconoce una parte de una proteína de fusión, y un anticuerpo de detección marcado, que reconoce otra parte de una proteína de fusión. En tal sistema, un anticuerpo de captura se une a una capa de soporte sólido, tal como una placa de ELISA o una tira reactiva para inmersión. El anticuerpo de captura también se puede inmovilizar sobre perlas que se pueden analizar mediante citometría de flujo⁹. Tras la incubación de un anticuerpo de captura con un lisado celular que se sospecha que contiene la proteína de fusión, se detecta la proteína de fusión unida mediante un anticuerpo de detección marcado. Aunque elegante y fácil de llevar a cabo, el sistema de anticuerpo de captura/de detección no se puede aplicar de forma práctica para detectar una proteína de fusión intracelular sin destruir la integridad celular. La mayoría de las proteínas de fusión específicas de tumores están localizadas intracelularmente, por ejemplo factores de transcripción nucleares, o moléculas de señalización que residen en el citoplasma o que van y vienen entre el citoplasma y el núcleo. De este modo, un sistema de anticuerpo de captura/de detección no permite la detección de una proteína de fusión intracelular a nivel de una sola célula.

La colocalización de dos anticuerpos marcados diferentemente frente a dos partes diferentes de una proteína de fusión podría en teoría demostrar la presencia de una proteína de fusión en una sola célula. Sin embargo, la prueba completa de la colocalización requiere el análisis mediante microscopía confocal de barrido por láser (CLSM). Incluso entonces generalmente no es sencillo evaluar la colocalización de dos anticuerpos, debido a que las proteínas normales reconocidas, que derivan de los genes normales en los cromosomas no afectados, pueden provocar una tinción de fondo que interfiere con la detección de la proteína de fusión. Además, la CLSM tiene la gran desventaja de que requiere un laboratorio especializado y bien equipado, y un personal entrenado y muy cualificado. Tal técnica altamente especializada y que consume tiempo no es deseable para procedimientos de diagnóstico rutinarios, por ejemplo en un marco clínico.

Todo lo anterior indica que existe una necesidad específica de un método mejorado para detectar una proteína de fusión, que se puede usar preferiblemente en un laboratorio clínico. Particularmente desafiante es la detección de una proteína de fusión intracelular a nivel de una sola célula.

La invención proporciona la idea de que se puede usar la tecnología de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para detectar la presencia de una proteína de fusión. La invención proporciona un conjunto de sondas, un kit de diagnóstico y un método para detectar la presencia de una proteína de fusión como se describe en las reivindicaciones anejas. La invención proporciona un método *in vitro* para detectar la presencia de una proteína de fusión en una célula usando un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda molecular, siendo cada sonda capaz de reconocer un sitio de unión situado en lados opuestos de la región de fusión de dicha proteína de fusión, cada sonda está provista además de un colorante en el que dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía, cada sonda está provista de un grupo reactivo que permite modular la organización espacial de dichas sondas tras la unión a la molécula de interés, provocando que dichos colorantes estén a una distancia de 100 Angstrom entre sí de forma que hay una probabilidad aumentada de transferencia de energía entre dichos colorantes, en el que un grupo reactivo de dicha primera sonda no está implicado en la unión a la molécula de interés y no es directamente reactivo con dicha segunda sonda y requiere una sustancia formadora de puentes capaz de unir a través de un puente al menos dos grupos reactivos para mediar la energía de transferencia entre los colorantes en dichas sondas, comprendiendo el método proporcionar un conjunto de sondas, proporcionar una muestra que comprende una célula, poner en contacto dicha muestra con dichas sondas en condiciones que permitan yuxtaponer dichas sondas sobre dicha proteína de fusión, poner en contacto dichas sondas con una sustancia formadora de puentes capaz de enlazar al menos un grupo reactivo de dicha primera sonda a dicha segunda sonda, y detectar la yuxtaposición de dichas sondas vía FRET, para determinar la presencia de dicha proteína de fusión. También se proporciona un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda molecular, siendo capaz cada sonda de unirse específicamente a una molécula de interés, y estando cada sonda provista de un colorante en el que dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía; en el que cada sonda está provista de un grupo reactivo para modular la organización espacial de dichas sondas tras la unión a la molécula de interés, haciendo que dichos colorantes estén a una distancia de 100 Ångstrom entre sí de forma que hay una probabilidad aumentada de transferencia de energía entre dichos colorantes, y en el que dicho grupo reactivo no está implicado en la unión a la molécula de interés, y en el que un grupo reactivo de dicha primera sonda no es directamente reactivo con dicha segunda sonda y requiere una sustancia formadora de puentes capaz de unir a través de un puente al menos dos grupos reactivos para mediar la energía de transferencia entre los colorantes en dichas sondas.

Según la invención, una sonda molecular es capaz de unirse específicamente a una molécula biológica de interés vía su denominado dominio de unión. Tras la unión de al menos una primera y una segunda sonda a una molécula de interés vía el dominio de unión, se puede usar un grupo reactivo para modular la yuxtaposición. Un grupo reactivo no tiene tendencia a competir con el dominio de unión por la unión a una molécula de interés. Aquí, un conjunto de sondas de la invención se distingue de conjuntos conocidos de sondas de anticuerpos que se agrupan o yuxtaponen mediante la mera unión a una molécula o complejo antigénico. Un grupo reactivo preferiblemente sigue estando

disponible para modular la organización espacial de sondas yuxtapuestas después de que la sonda se una a una molécula de interés. Dicha molécula de interés es una proteína, preferiblemente una proteína de fusión, más preferiblemente una proteína de fusión oncogénica. La invención proporciona un conjunto de una primera y una segunda sonda molecular en la que cada sonda es capaz de reconocer y unirse a un sitio de unión (epítipo) situado en lados opuestos de la región de fusión de dicha proteína de fusión. Por supuesto, cuando se usa un conjunto de sondas en el que cada sonda se une a un epítipo diferente de una molécula de interés (por ejemplo epítipos en el lado C- y N-terminal de la región de fusión de una proteína de fusión), dichos diferentes epítipos no deberían de interactuar entre sí de ninguna manera inter- o intramolecular, debido a que esto interferiría obviamente con la unión a la sonda. Por lo tanto, diferentes sondas dentro de un conjunto de sondas son capaces de unirse a diferentes epítipos, que esencialmente no interactúan. Esto es diferente de la situación descrita en el documento WO 01/75453, que se refiere a métodos para detectar una entidad en virtud de dos sondas (informadores), en los que las dos sondas se pueden unir al mismo sitio diana en la entidad, bien sustancialmente de forma simultánea o bien secuencialmente, o a diferentes sitios diana. Los informadores/sondas del documento WO 01/75453 se pueden usar para detectar una proteína de fusión química. Se menciona que un informador se une preferiblemente a un dominio SH2, y el otro informador se une a un sitio de unión a SH2, es decir, los informadores del documento WO 01/75453 se unen preferiblemente a epítipos que interactúan. Tales sondas y métodos de detección son claramente distintos de la presente invención debido a que un método a base de FRET como se proporciona aquí simplemente no funcionaría cuando se usa un conjunto de sondas en el que diferentes sondas se dirigen frente a epítipos idénticos o que interactúan. Además, ninguna de las sondas del documento WO 01/75453 está provista de un grupo reactivo que permite la yuxtaposición de las sondas. El documento WO 02088733 describe anticuerpos que se unen a epítipos en una molécula de interés. Cada uno de estos constructos comprende un fluorocromo que permite FRET cuando están próximos, así como cremalleras de leucina.

La presente invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende un conjunto de sondas como se describe en las reivindicaciones anejas y un método para usar un conjunto de sondas para detectar la presencia de una proteína de fusión como se describe en las reivindicaciones anejas. El método se puede usar en el diagnóstico y/o clasificación de una enfermedad, así como antes, durante y después del tratamiento de una enfermedad, para evaluar la eficacia de dicho tratamiento.

También se describe un método para producir un conjunto de sondas según la invención, que comprende poner en contacto cada sonda con un colorante para formar un conjugado entre dicha sonda y dicho colorante, y purificar dicho conjugado, que comprende además poner en contacto cada sonda con un grupo reactivo o un derivado del mismo para formar un conjugado entre dicha sonda y dicho grupo reactivo, y purificar dicho conjugado.

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es una interacción dependiente de la distancia entre los estados excitados electrónicos de dos moléculas colorantes, en la que una molécula "donante", tras la excitación mediante una fuente de luz, transfiere su energía a una molécula "aceptora". En general, los colorantes donantes y aceptores son diferentes, en cuyo caso FRET se puede detectar por la aparición de fluorescencia sensibilizada del aceptor, o mediante extinción de la fluorescencia del donante. Cuando los colorantes donantes y aceptores son los mismos, FRET se puede detectar mediante la despolarización de la fluorescencia resultante. La transferencia de energía se produce cuando el espectro de emisión del aceptor se solapa significativamente. Para lograr la transferencia de energía por resonancia, el donante debe absorber luz y transferirla a través de la resonancia de electrones excitados al receptor¹⁰⁻¹³. FRET se basa habitualmente en la interacción entre colorantes donantes y aceptores que son ambos fluorescentes. Sin embargo, también se pueden usar colorantes aceptores no fluorescentes. Los colorantes aceptores no fluorescentes pueden ser ventajosos debido a que eliminan la fluorescencia de fondo que resulta de la excitación directa (es decir, no sensibilizado) del aceptor. En la presente invención, es posible monitorizar sondas yuxtapuestas en una proteína de fusión usando un colorante donante fluorescente y un colorante aceptor no fluorescente. La unión específica de un conjunto de sondas a las proteínas nativas, por ejemplo proteínas A y B, dará una señal de fluorescencia basal. Con la cercana yuxtaposición de un conjunto de sondas en una proteína de fusión A-B, FRET entre las sondas extinguirá la fluorescencia del donante. En lugar de mediar un incremento en la fluorescencia del aceptor, el uso de un aceptor no fluorescente implica medir una disminución en la fluorescencia del donante. Hablando de forma general, la detección de una señal disminuida es menos sensible en comparación con la detección de una señal incrementada. Por lo tanto, un método según la invención se practica preferiblemente usando un donante fluorescente y un colorante aceptor fluorescente.

Para que tenga lugar la transferencia de energía, la longitud de onda de emisión de la fluorescencia del donante debe de ser menor que la longitud de onda de excitación del aceptor; esto es, el proceso debe de ser energéticamente "cuesta abajo". La yuxtaposición suficientemente cercana de los dos colorantes, generalmente más cercana que 100 Ångstrom, pero preferiblemente más cercana que 50 Ångstrom, es esencial para la transferencia de energía entre el par donante/aceptor. Un Ångstrom, una unidad métrica de longitud, es igual a 0,1 nanómetros o 10^{-10} metros. La eficiencia de la transferencia de energía de FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el donante y el aceptor. Se proporciona la idea de que, debido a su elevada sensibilidad a la

distancia, FRET es especialmente adecuada para detectar la yuxtaposición de dos sondas conjugadas con colorantes diferentes en una proteína de fusión.

En una realización preferida de la invención, un conjunto de sondas comprende un conjunto de al menos dos anticuerpos conjugados con colorantes, siendo capaz cada anticuerpo de reconocer un sitio de unión situado en
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

La reactividad simultánea de más de un anticuerpo diferente con la misma molécula proteica necesita el reconocimiento de dos sitios de unión o epítomos diferentes que están suficientemente separados a fin de prevenir el impedimento estérico de los anticuerpos. Por ejemplo, la aplicación simultánea de un anticuerpo frente a los dominios variables (V) y un anticuerpo frente a los dominios constantes (C) de las moléculas del receptor de células T (TCR) sobre la superficie celular de un linfocito T no da resultados fiables y reproducibles. Sin embargo, la aplicación simultánea de anticuerpos frente al dominio V y un anticuerpo frente a la molécula CD3, que está estrechamente asociada con la molécula de TCR, produjo excelentes resultados de tinción tanto en citometría de flujo como en microscopía¹⁴. Estos datos sugieren que la distancia entre dos epítomos en la misma proteína debería de ser preferiblemente más de aproximadamente 80 Ångstrom para que sean reconocidos simultáneamente.

La colocación de dos anticuerpos conjugados a colorantes frente a diferentes partes de la misma proteína de fusión no es algunas veces suficiente para la transferencia de energía de FRET requerida. Un anticuerpo completo es una molécula proteica con forma de Y grande, de un tamaño de ~150 kDa, formada por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. Debido a la longitud de una molécula de anticuerpo (300 a 400 Ångstrom) y la flexibilidad de la región bisagra, las moléculas de anticuerpo yuxtapuestas pueden unir mediante un puente una distancia relativamente grande¹⁵. Mientras que las sondas de FRET cercanamente yuxtapuestas son en general insuficientes para obtener una señal de FRET, puede ser ventajoso estabilizar y/o potenciar la yuxtaposición de dos sondas a fin de incrementar la eficiencia de FRET. Por ejemplo, el tamaño de una sonda o de un colorante puede interferir con el análisis de FRET vía efectos estéricos negativos. También, la flexibilidad de un anticuerpo puede disminuir la probabilidad de la aparición de FRET entre un par de colorantes de FRET que están conjugados con sondas de anticuerpos. Cuando se prepara un conjugado de colorante, como una sonda fluorescente, en general no es posible controlar el sitio de conjugación. Por ejemplo, en el caso de la conjugación de un anticuerpo, un resto de colorante se puede unir a diferentes partes de la molécula de anticuerpo. Dependiendo del sitio de la conjugación con el colorante, la orientación espacial de los colorantes en las sondas puede ser favorable o desfavorable para la eficiencia de la transferencia de energía de FRET, es decir, los colorantes unidos a sondas no necesitan estar necesariamente dentro de la distancia de transferencia de energía entre sí.

Sorprendentemente, la invención proporciona la idea de que la yuxtaposición de un conjunto de sondas se puede modular a fin de incrementar la probabilidad de la transferencia de energía de FRET entre un par de colorantes, proporcionando al menos una sonda con un grupo reactivo. La invención proporciona un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda molecular como se describe en las reivindicaciones anejas, estando cada sonda provista de un colorante, en el que dichos colorantes permiten juntos la transferencia de energía; comprendiendo cada sonda un grupo reactivo que permite yuxtaponer dicha al menos primera y segunda sonda, en el que dicho grupo reactivo permite modular la yuxtaposición de dichas sondas de tal forma que hay una probabilidad incrementada de transferencia de energía entre dichos colorantes. El uso de tal conjunto de sondas permite detectar sondas yuxtapuestas con una sensibilidad mejorada en comparación con el uso de sondas que no comprenden ningún grupo reactivo.

En el presente contexto, la expresión "grupo reactivo" se refiere a un resto que permite modular la organización espacial de colorantes de FRET por medio de una sustancia formadora de puentes capaz de unir mediante un puente al menos dos grupos reactivos de forma que hay un incremento en la probabilidad de que se produzca la transferencia de energía y/o un incremento en la eficiencia de la transferencia de energía. La organización espacial se refiere tanto a la distancia entre los colorantes así como también a su orientación relativa. Modular la organización espacial incluye ajustar y estabilizar la organización espacial de los colorantes. Una de las condiciones principales para que se produzca la transferencia de energía es que las moléculas donante y aceptora deben de estar en estrecha proximidad, típicamente 10-100 Å. Según la invención, un grupo reactivo permite yuxtaponer

dichos colorantes en una distancia de 100 Å entre sí, preferiblemente en 50 Å entre sí, pero más preferiblemente en una distancia de 20 Å entre sí. Por lo tanto, se prefiere que un grupo reactivo sea pequeño, por ejemplo más pequeño que 10 kiloDalton (kD), mejor más pequeño que 5 kDa, incluso mejor más pequeño que 2 kDa, o lo mejor más pequeño que 1 kDa. Por ejemplo, un grupo reactivo es biotina.

Según la invención, un grupo reactivo de una primera sonda no es directa o inmediatamente reactivo con una segunda sonda, a fin de evitar la auto-asociación de dichas sondas. Esto es ventajoso para un reconocimiento óptimo de una proteína de fusión por cada sonda, y para yuxtaponer dichas sondas en dicha proteína de fusión. Además, evita que se produzca inoportunamente la transferencia de energía entre sondas directamente conectadas o multimerizadas, y disminuye una señal de fondo no específica. Esto es importante para asegurarse de que una señal de transferencia de energía refleja verdaderamente sondas yuxtapuestas.

La invención proporciona la idea de que, si un grupo reactivo de una primera sonda no es reactivo con al menos una segunda sonda a fin de evitar la auto-asociación de dichas sondas, se ha de usar una sustancia denominada "formadora de puentes", para mediar una interacción entre dichas sondas, que permita modular la yuxtaposición de dichas sondas de forma que haya una probabilidad incrementada de transferencia de energía entre los colorantes en dichas sondas. Una sustancia puede ser cualquier tipo de compuesto capaz de unirse a o modificar una sonda, un grupo reactivo y/o un colorante para modular la organización espacial de colorantes en sondas yuxtapuestas, de forma que sea favorable para la FRET. Una sustancia permite la yuxtaposición de dichos colorantes dentro de una distancia de 2 a 100 Ångstrom entre sí. Dicha sustancia se añade a una muestra tras la unión de las sondas conjugadas a colorantes a una proteína de fusión diana, en una cantidad eficaz para modular la organización espacial de dichos colorantes en las sondas yuxtapuestas. Ventajosamente, dicha sustancia se une a un grupo reactivo con una especificidad elevada y una alta afinidad. También, se prefiere que tal sustancia sea relativamente pequeña, de forma que la sustancia formadora de puentes afecte sólo mínimamente a la distancia entre un par de colorantes y la orientación relativa de un par de colorantes. Se describe un método para detectar la presencia de una proteína de fusión en una célula usando un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda molecular, siendo capaz cada sonda de reconocer un sitio de unión situado en lados opuestos de la región de fusión de dicha proteína de fusión, cada sonda está provista además de un colorante en el que dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía, cada sonda está provista de un grupo reactivo que permite modular la yuxtaposición de dicha al menos primera y dicha segunda sondas de tal forma que hay una probabilidad incrementada de transferencia de energía entre dichos colorantes, en el que un grupo reactivo de dicha primera sonda no es directamente reactivo con dicha segunda sonda, que comprende proporcionar un conjunto de sondas, proporcionar una muestra que comprende una célula, poner en contacto dicha muestra con dichas sondas en condiciones que permitan yuxtaponer dichas sondas sobre dicha proteína de fusión, eliminar cualquier sonda no unida y cualquiera unida no específicamente, poner en contacto dichas sondas con una sustancia capaz de enlazar al menos un grupo reactivo de dicha primera sonda a dicha segunda sonda, y detectar la yuxtaposición de dichas sondas vía FRET, para determinar la presencia de dicha proteína de fusión.

Un método que usa un conjunto de sondas tiene varias ventajas. En primer lugar, se puede lograr una especificidad mejorada y una tinción de fondo reducida en comparación con un método que use sondas que interaccionan directamente. Después de todo, para que un grupo reactivo ejerza su efecto vía una sustancia formadora de puentes, las sondas necesitan estar en una yuxtaposición cercana entre sí antes de la adición de dicha sustancia, es decir, resultante de la unión de una sonda adyacente a otra sonda en la misma proteína de fusión. En segundo lugar, el procedimiento es rápido y fácil, debido a que no se requieren etapas de puesta en contacto/lavado separadas para cada sonda individual. De este modo, permite poner en contacto una muestra con una mezcla de sondas todas juntas en una sola acción. Igualmente, cualesquiera sondas no unidas y cualesquiera sondas unidas no específicamente se eliminan simultáneamente.

Como se ejemplifica aquí en la descripción detallada, se proporciona un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda molecular, estando cada sonda provista de un colorante, en el que dichos colorantes permiten juntos la transferencia de energía; estando cada sonda provista de un grupo reactivo. Una sustancia es capaz de unir, o "unir mediante la formación de un puente", al menos dos grupos reactivos. En una realización preferida, cada sonda en un conjunto de sondas está provista del mismo grupo reactivo. También, cada sonda en un conjunto de sondas puede estar provista de un grupo reactivo diferente pero que tiene la misma actividad. Esto permite el uso de un tipo de sustancia formadora de puentes que tenga al menos dos sitios de unión idénticos para un grupo reactivo.

En una realización preferida, una sonda está provista de más de un grupo reactivo, permitiendo a dicha sonda interaccionar con más de una molécula de la sustancia formadora de puentes. Al proporcionar una sonda con más de un grupo reactivo, teóricamente aumentará la probabilidad de una interacción entre dicha sonda y una sustancia formadora de puentes. Además, para poner en práctica de forma fácil la presente invención, existe comercialmente un grupo reactivo adecuado, o un derivado del mismo, y se puede unir fácil y eficazmente a una sonda.

Según la presente invención, un grupo reactivo particularmente interesante es biotina, siendo una sustancia formadora de puentes particularmente adecuada la avidina o la estreptavidina. La avidina es una glucoproteína

derivada de la clara del huevo, con un peso molecular de alrededor de 68000 daltons y un diámetro de 8 a 10 Ångstrom. Consiste en cuatro cadenas subunitarias idénticas. Una molécula de avidina o de estreptavidina se puede unir a cuatro moléculas de biotina. La avidina tiene una afinidad extraordinariamente elevada (constante de afinidad $> 10^{15}$ M⁻¹) por la biotina. Esta afinidad elevada asegura al usuario un complejo formado rápidamente y estable entre avidina y las sondas marcadas con biotina. La proteína estreptavidina, producida por la bacteria *Streptomyces avidinii*, tiene una estructura muy similar a la avidina, y también se une fuertemente a la biotina. A menudo muestra una menor unión no específica, y de este modo se usa frecuentemente en lugar de avidina. Una vez que se forma un complejo de biotina-avidina, el enlace es esencialmente irreversible. El sistema de biotina-avidina se usa ampliamente, y ha demostrado ser muy útil en la detección y localización de antígenos, glucoconjugados, y ácidos nucleicos empleando anticuerpos biotinilados, lectinas, o sondas de ácidos nucleicos. Como se ha dicho, un grupo reactivo con tal pequeño tamaño es ventajoso para lograr una distancia corta entre un par de colorantes. La biotina es una vitamina, con un peso molecular de sólo 244 daltons. También, muchas moléculas de biotina se pueden acoplar a una proteína, permitiendo que la proteína biotinilada se una a más de una molécula de avidina. La avidina, estreptavidina y la biotina están disponibles de muchas fuentes comerciales. Los expertos en la técnica conocen diversos procedimientos estándar para preparar conjugados de biotina, la mayoría de los cuales se pueden completar en un día. Además, existen kits de biotinilación comerciales que contienen todos los componentes necesarios para la biotinilación de proteínas.

Si se usa un conjunto de sondas, en el que cada sonda está provista de un grupo reactivo diferente, una sustancia adecuada comprende una molécula capaz de unirse a al menos uno de cada grupo reactivo. Como alternativa, tal sustancia de unión comprende un complejo de al menos dos moléculas que pueden estar unidas covalente o no covalentemente entre sí, en el que cada molécula es capaz de unirse a un grupo reactivo.

La invención proporciona un método para detectar una proteína de fusión a nivel de una sola célula usando un conjunto de sondas según la invención, siendo capaz cada sonda de unirse a un sitio de unión situado en lados opuestos de una región de fusión de dicha proteína de fusión vía el dominio de unión de la sonda, es decir, una sonda está dirigida contra un fragmento proteico que comprende el fragmento N-terminal de una proteína de fusión, y otra sonda está dirigida contra un fragmento proteico que comprende el fragmento C-terminal de la misma proteína de fusión. Una proteína de fusión comprende cualquier tipo de sustancia proteínica que se forma después de la transcripción y traducción de un gen de fusión. Un gen de fusión comprende una parte de uno o más genes combinada con otro gen o una parte derivada del mismo. Una proteína de fusión puede ser el resultado de una translocación, inversión o supresión cromosómica. En una realización preferida, el método proporcionado se usa para detectar una proteína de fusión específica de un tumor. Una proteína de fusión puede ser una proteína expresada endógenamente, o puede ser el resultado de una manipulación genética. Las proteínas de fusión en neoplasias que ya se pueden detectar fácilmente usando un método según la invención incluyen pero no se limitan a las enumeradas en la Tabla I.

Es de gran relevancia señalar que el presente método no requiere la destrucción de la integridad celular, por ejemplo la preparación de un lisado celular, para detectar la presencia de una proteína de fusión intracelular. La conservación de la integridad de la morfología de una célula permite el análisis a nivel de una sola célula, por ejemplo mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. La detección de una señal de FRET mediante citometría de flujo ofrece la capacidad de llevar a cabo un análisis rápido, multiparamétrico, de células individuales específicas, en una población heterogénea. La ventaja principal de la citometría de flujo es que da directamente datos cuantitativos, y que es muy rápida (los resultados se pueden obtener en unas pocas horas).

El método proporcionado en la presente invención permite la detección de una proteína de fusión a nivel de una sola célula. En una realización preferida, el método proporcionado se usa para detectar una proteína intracelular a nivel de una sola célula. Cuando se detecta una proteína de fusión intracelular, se trata una muestra que comprende una célula para obtener una permeabilización del material y una conservación de la morfología. El tratamiento preferido es aquel que fija y conserva la integridad morfológica de la matriz celular y de las proteínas en la célula, así como permite el grado más eficiente de penetración de la sonda, por ejemplo anticuerpo.

A diferencia de, por ejemplo, un método de anticuerpo de "captura/detección", que sólo se puede aplicar esencialmente para detectar la presencia de una proteína de fusión en la superficie celular o en un lisado celular, el presente método permite seleccionar en una ventana de análisis un subconjunto de células que están presentes en una mezcla de células vía características inmunofenotípicas. Por consiguiente, el método proporcionado aquí permite la detección de una proteína de fusión en una población rara de células neoplásicas en un gran escenario de células normales. Esto es especialmente ventajoso para detectar frecuencias bajas de células positivas a la fusión, como en el caso de la detección de una enfermedad residual mínima (MRD) durante o después del tratamiento para la evaluación de la eficacia del tratamiento. En una realización preferida, el método proporcionado incluye citometría de flujo de múltiples parámetros, para identificar y/o aislar células individuales para detectar la presencia de una proteína de fusión a nivel de una sola célula. Todo lo que se requiere para practicar el método proporcionado es un

equipo de citometría de flujo. De forma importante, el procedimiento se puede llevar a cabo en laboratorios habituales por personal con pericia normal.

Se ha descrito más de un centenar de genes de fusión y proteínas de fusión diferentes en diversos tipos de cáncer. Como se ha dicho, el método proporcionado permite discriminar entre la presencia de proteínas normales y una proteína de fusión aberrante a nivel de una sola célula. Teóricamente, dos anticuerpos que reconocen dos dominios diferentes de una proteína de fusión pueden provocar una tinción de fondo uniéndose a los dominios en las proteínas normales que derivan de los genes normales, en lugar del gen de fusión. Sin embargo, generalmente sólo una de las dos proteínas normales alcanza un nivel de expresión detectable en una población celular diana, como se define por los marcadores de la superficie celular y/o intracelulares. Además, las proteínas normales y la proteína de fusión a menudo difieren en su patrón de expresión intracelular, dando frecuentemente como resultado una localización subcelular diferente^{16,17}. Esto implica que es improbable que se produzca a nivel significativo en una población celular diana la colocalización coincidente de las dos proteínas normales diferentes. En particular, la yuxtaposición coincidente de sondas suficiente para una señal de FRET será rara en células normales, si es que acaso se produce.

Se proporciona aquí un método para producir un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda molecular según la invención conjugada con colorantes de FRET, comprendiendo dicho método poner en contacto cada sonda con un colorante para formar un conjugado entre dicha sonda y dicho colorante, y purificar dicho conjugado, comprendiendo además poner en contacto cada sonda con un grupo reactivo o un derivado del mismo para formar un conjugado entre dicha sonda y dicho grupo reactivo, y purificar dicho conjugado. El radio de Förster (R_0) es la distancia que corresponde a una eficiencia de la transferencia de energía de 50%, y caracteriza a cada par de donante/aceptor. Su valor está generalmente entre 30 y 60 Ångstrom. En el presente contexto, el término colorante se refiere a un sustituyente que, en concierto con otro colorante, se puede usar para el análisis de transferencia de energía, a saber, el análisis de FRET. Como se menciona anteriormente, FRET se basa habitualmente en la interacción entre colorantes donantes y aceptores que son ambos fluorescentes. La invención usa un conjunto de sondas en las que al menos uno de dichos colorantes es un fluorocromo. Sin embargo, también se puede usar un aceptor no fluorescente, y la FRET se detecta extinguiendo la fluorescencia del donante. Como se ha dicho, la detección de FRET monitorizando una disminución en la fluorescencia del donante como consecuencia de sondas yuxtapuestas a menudo no es tan sensible como la detección del incremento en la fluorescencia del aceptor. De este modo, en una realización preferida, al menos se usan dos sondas marcadas fluorescentemente para detectar una proteína de fusión, como se ejemplifica en la descripción detallada. Los ejemplos de fluorocromos preferidos son aquellos adecuados para el análisis mediante citometría de flujo convencional, e incluyen marcadores de fluoresceína, por ejemplo 5-(y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, 6-(fluorescein)-5-(y 6)-carboxamida del ácido hexanoico, e isotiocianato de fluoresceína, colorantes Alexa Fluor, tales como Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594, colorantes de cianina, tales como Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, cumarina opcionalmente sustituida, R-ficoeritrina, alofcoeritrina, Rojo de Tejas y Rojo de Pinceston, así como conjugados de R-ficoeritrina y, Por ejemplo, Cy5 o Rojo de Tejas y miembros de las ficobiliproteínas. Otros colorantes de interés son colorantes de nanocristales semiconductores, que poseen una paleta de colores casi ilimitada. La información extensa sobre pares de donantes/aceptores adecuados para la detección de la transferencia de energía mediante citometría de flujo se puede encontrar en Szollosi et al.¹⁸. Combinaciones preferidas de fluorocromos comprenden aquellos colorantes usados en conjugados en tándem clásicos, también denominados como duocromos¹⁹.

El método proporcionado comprende proporcionar una muestra que comprende una célula, con lo que dicha muestra se somete opcionalmente a fijación y permeabilización si se va a detectar una proteína de fusión intracelular. Una muestra puede comprender una célula primaria que se obtiene de una muestra biológica. Una muestra biológica puede ser una muestra de fluido corporal, incluyendo sangre, suero, orina, médula ósea, líquido cerebroespinal (CSF), saliva. También puede ser una muestra tisular, homogenado tisular. Una muestra comprende una célula cultivada que puede ser una célula primaria cultivada, por ejemplo células tumorales obtenidas de una biopsia de ganglios linfáticos. Además, una muestra puede comprender una célula cultivada procedente de una estirpe celular de laboratorio consolidada, como una estirpe celular K562, KASUMI-1, REH o CEM, que se puede obtener de un número de fuentes tales como la American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org para un catálogo en línea). El método proporcionado es adecuado para detectar la presencia de una proteína de fusión endógena, así como una proteína de fusión recombinante, en una célula.

Para analizar una muestra que comprende una suspensión de células, se prefiere que la muestra sea tratada para obtener una conservación de la morfología del material y la permeabilización a fin de asegurar una accesibilidad suficiente de una molécula de interés a una sonda. El tipo de tratamiento dependerá de varios factores, por ejemplo del fijador usado, el grado de fijación y el tipo y propiedades de la molécula de interés. La fijación se puede llevar a cabo con un fijador tal como formaldehído.

Para la detección de una proteína de fusión en células primarias, es especialmente ventajoso usar un marcador adicional para definir una población celular diana de interés. Un número de aplicaciones biológicas importantes en

enfermedades infecciosas, detección y monitorización de MRD, y terapia génica requieren típicamente el análisis y aislamiento de células raras (por ejemplo células madre/progenitoras hematopoyéticas) a partir de un gran escenario. En una realización de la invención, el método incluye teñir una muestra para al menos un marcador celular, como un marcador de la superficie celular o un marcador intracelular, para definir una población celular diana en una mezcla de células, que comprende poner en contacto dicha muestra con un compuesto capaz de unirse selectivamente a dicho marcador. En una realización preferida, tal compuesto se etiqueta directamente con un colorante fluorescente. Un compuesto adecuado comprende un anticuerpo marcado fluorescentemente o un fragmento de unión funcionalmente equivalente al mismo. También, se puede usar un compuesto capaz de unirse selectivamente a un marcador celular, que se puede detectar usando un reactivo secundario conjugado a colorante (por ejemplo un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente). Un marcador celular comprende cualquier tipo de marcador intracelular o unido a la membrana, el cual se puede usar para distinguir una subpoblación de células en una mezcla de células. Una mezcla de células comprende células vivas. También comprende células permeabilizadas y/o fijadas. Un marcador celular puede ser un antígeno del agrupamiento de diferenciación (CD). Los marcadores de CD son moléculas de la superficie celular de, entre otras, células hematopoyéticas que son distinguibles con anticuerpos monoclonales. Las células hematopoyéticas comprenden timocitos, células dendríticas, células de Langerhans, neutrófilos, eosinófilos, células B de centro germinal, células dendríticas foliculares, células plasmáticas y células de la médula ósea. Por ejemplo, los marcadores celulares adecuados comprenden CD1, CD3, CD4, CD8, CD10, CD19, CD20, CD33, CD34 y CD117. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un gran número de marcadores de CD humanos se pueden obtener de diversos proveedores, tales como BD Biosciences o Ancell Immunology Research Products, Bayport, USA. A menudo, existen anticuerpos que están conjugados directamente con un fluorocromo de elección, por ejemplo CD10-PE o CD19-FITC, que obviamente es una elección preferida para poner en práctica un método según la invención.

En la presente descripción se describe un método para identificar y/o aislar células individuales raras usando técnicas de citometría de flujo multiparamétrica/clasificación de células, y para caracterizar además estas células mediante la presencia o ausencia de una proteína de fusión de interés. Tal método es particularmente adecuado para la aplicación a un número de problemas importantes en el desarrollo de sistemas inmunitarios, enfermedades infecciosas, cáncer y terapia génica. Típicamente, antes de teñir una muestra de células con un conjunto de sondas, las células se marcan con al menos un anticuerpo conjugado con colorante relevante según procedimientos estándar, a fin de definir una población celular diana. La elección del colorante debería estar dirigida preferiblemente, pero no exclusivamente, al uso de dos o tres colorantes para inmunofenotipado, además de los colorantes de FRET para la detección de una proteína de fusión. Por ejemplo, un conjunto de sondas de FRET según la invención se puede combinar con otro colorante para mediar la selección de un conjunto de leucocitos vía características inmunofenotípicas, por ejemplo CD10, CD19 y CD20 para definir con exactitud subconjuntos de células B precursoras en médula ósea, o CD1, CD4 y CD8 para definir subconjuntos de timocitos, o CD34 y/o CD117 para identificar poblaciones de células madre/precursoras. Como se muestra aquí en la descripción detallada, la invención proporciona un método que permite la detección de una proteína de fusión intracelular en un subconjunto muy pequeño de células, es decir, la detección de MRD, que es esencial para evaluar la eficacia del tratamiento contra el cáncer.

La invención proporciona un kit de ensayo de diagnóstico para detectar la presencia de una proteína de fusión en una célula, que comprende un conjunto de sondas según la invención. Por ejemplo, tal kit se puede usar para monitorizar y cuantificar células neoplásicas, por ejemplo células leucémicas, vía la detección de células positivas a proteínas de fusión específicas de un tumor. El kit de ensayo de diagnóstico proporcionado aquí es útil en el momento del diagnóstico, así como también durante y después del tratamiento, para evaluar la eficacia del protocolo del tratamiento contra el cáncer aplicado.

Tabla I. Ejemplos de proteínas de fusión en neoplasias que se pueden detectar vía tecnología de FRET mediada por anticuerpos.

Neoplasia	Aberración cromosómica	Proteína de fusión
Célula B-ALL Precursora	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;22)(q24;q12)	EWS-FLI1

5 Leyendas de las figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de un gen de fusión que consiste en la parte en dirección (5') de un gen A y la parte en dirección (3') del gen B. Este gen de fusión A-B se transcribe en ARNm de A-B y se traduce en una proteína de fusión A-B.

Figura 2. Diagrama esquemático del principio de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) con el fluorocromo X como colorante donante, e Y como colorante aceptor. **A.** El colorante aceptor Y no se excitará por la luz de emisión del colorante donante X si la distancia entre X e Y es demasiado grande. **B.** Si la distancia entre el colorante donante y el aceptor es suficientemente pequeña (< 80 Ångstrom, pero preferiblemente < 50 Ångstrom), la luz de emisión del colorante donante X excitará al colorante aceptor Y.

Figura 3. Diagrama esquemático de la proteína de fusión A-B reconocida por un conjunto de sondas de anticuerpos anti-A y anti-B. **A.** La sonda A se conjuga con el colorante donante X, y la sonda B se conjuga con el colorante aceptor Y (véase la Figura 2). Además, ambas sondas están conjugadas con biotina como grupo reactivo. **B.** Tras la incubación con las sondas de anticuerpos A y B, las sondas se pueden unir juntas vía incubación con avidina, con la condición de que las dos sondas reconozcan y se unan de hecho a la misma proteína de fusión A-B. Esta yuxtaposición de los dos anticuerpos (estabilizados mediante el sistema de biotina-avidina) es detectable vía el principio de FRET (véase la Figura 2).

Figura 4. Ejemplo de detección, mediada por FRET, de la proteína de fusión TEL-AML1 en células ALL.

A. Células B-ALL precursoras en el diagnóstico. Confinamiento citométrico de flujo de blastocitos ALL como se define mediante características de dispersión de luz (*izquierda*), seguido del confinamiento de blastocitos CD19+ (*centro*), y evaluación de la presencia de la proteína de fusión TEL-AML1 en las células CD10⁺/CD19⁺ ALL (*derecha*).

B. Células B-ALL precursoras durante el seguimiento. Detección citométrica de flujo de frecuencias bajas de células positivas a TEL-AML1 (enfermedad residual mínima) durante el seguimiento para la evaluación de la eficacia del tratamiento. Sólo el 3% de los blastocitos CD10+ fueron positivos par la proteína de fusión TEL-AML1, es decir, sólo 0,2% de leucocitos totales.

Descripción detallada

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a un método para determinar la presencia de una proteína de fusión en una célula usando un conjunto de sondas. Este método se puede usar para diagnosticar varios tipos de cáncer que implican translocaciones, inversiones o supresiones cromosómicas que dan lugar a un gen de fusión. Por ejemplo, aproximadamente el 35% de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (ALL) y leucemia mieloide crónica (CML) están asociados con un defecto cromosómico específico, una translocación entre los cromosomas 9 y 22 que crea el cromosoma de Filadelfia (Ph). Esta translocación se produce

en el sitio en el genoma de una proteína tirosina cinasa denominada ABL, creando la proteína de fusión BCR-ABL anormal, un producto génico de la fusión en el marco del gen *ABL* con otro gen denominado *BCR*. Generalmente, las proteínas de fusión desempeñan un papel importante en el proceso oncogénico. Por ejemplo, la actividad de cinasa de ABK en la proteína de fusión BCR-ABL está activada y desregulada, conduciendo al crecimiento celular incontrolado observado en ALL y en CML. Cuando se diagnostica leucemia linfoblástica aguda en un paciente, que comprende típicamente citogenética tradicional tal como el análisis de cariotipo para el cromosoma Ph, el número total de células de leucemia se aproxima a 10^{11} a 10^{13} . Una mayoría de pacientes alcanzan una remisión total después de alrededor de 5 semanas de quimioterapia. La remisión total no significa que las células leucémicas están totalmente erradicadas del cuerpo, sino que su nivel está más allá del nivel de sensibilidad de los métodos citomorfológicos clásicos (por ejemplo 1 a 5%). En este momento, todavía quedan en el paciente hasta 10^{10} células neoplásicas. Representan la enfermedad residual mínima (MRD). La detección de frecuencias bajas de células neoplásicas residuales permite un seguimiento más prolongado de la carga tumoral durante quimioterapia, y de este modo permite apreciar mejor la sensibilidad de las células leucémicas al tratamiento. Ahora se ha establecido que el nivel de MRD representa un factor de pronóstico poderoso para el resultado final. Además, la detección de un incremento del nivel de MRD permite anticipar una recaída inminente. El método proporcionado en la presente invención permite discriminar entre la presencia de proteínas normales y una proteína de fusión aberrante a nivel de una sola célula.

Como ejemplo de este método, se describirá la preparación de un conjunto de sondas para la detección de la proteína de fusión TEL-AML1. También se describe un método que usa este conjunto de sondas para detectar la presencia de la proteína de fusión TEL-AML1 en células ALL en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento, para detectar el nivel de MRD.

Ejemplo

Preparación de un conjunto de sondas

Preferiblemente, un conjunto de sondas según la invención comprende un conjunto de dos anticuerpos conjugados a fluorocromos, estando cada anticuerpo provisto adicionalmente de un grupo reactivo. Los métodos para producir un anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, para obtener un anticuerpo policlonal, se inmuniza un animal de laboratorio con un inmunógeno, tal como una proteína recombinante o un péptido sintético. La respuesta inmunitaria del animal se monitoriza extrayendo sangre de ensayo y determinando el título de la reactividad. Cuando se obtienen títulos apropiadamente elevados, se recoge sangre del animal y se preparan antisueros. Si se desea, se puede realizar un fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecerlos en anticuerpos reactivos a la proteína. Véase, por ejemplo, Harlow et al. *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo fusionando células de bazo de ratones inmunizados con una estirpe celular de mieloma mediante adición de polietilenglicol (PEG). Las células fusionadas se cultivan en un medio de selección, por ejemplo medio que contiene una mezcla de hipoxantina, aminopterina y timidina. Las células fusionadas que sobreviven en este medio de selección se ensayan para la producción del anticuerpo deseado (a menudo mediante inmunoensayo en fase sólida, tal como ELISA) y, si son positivos, los cultivos se clonan de forma que haya una sola célula en cada pocillo de cultivo. Esto produce un clon de células a partir de un único progenitor que es tanto inmortal como un productor de anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos obtenidos se pueden caracterizar usando técnicas de inmunodiagnóstico convencionales, por ejemplo mediante transferencia Western usando lisados de células que expresan una proteína de fusión recombinante, o mediante ELISA.

Biotinilación de anticuerpos

La biotina se conjuga típicamente a proteínas vía aminos primarias (es decir, lisinas). Habitualmente, se conjugan a cada anticuerpo entre 3 y 6 moléculas de biotina. Dialícese o intercámbiese el anticuerpo a lo largo de una columna en 100 mM de carbonato, pH 8,4. Mídase la concentración de anticuerpo tras equilibrado en tampón. (Para IgG, 1 mg/ml tiene una A_{280} de 1,4). Si la concentración de anticuerpo es menor que 1 mg/ml, la conjugación será probablemente subóptima. Si es necesario, dilúyase el anticuerpo hasta una concentración de 4 mg/ml. Disuélvanse 10 mg de biotina (N-hidroxisuccinimidobiotina, Pierce) en 1 ml de DMSO anhidro (dimetilsulfóxido anhidro, Aldrich) inmediatamente antes del uso. La molécula de biotina reactiva es inestable. Una vez que se solubiliza la biotina, se debería de usar inmediatamente. Añádase biotina para dar una relación de 80 μ g por mg de anticuerpo; mézclese inmediatamente. Envuélvase el tubo en un papel metálico; incúbase y hágase girar a temperatura ambiente durante 2 horas. Elimínese la biotina sin reaccionar, e intercámbiese el anticuerpo en 10 mM de Tris pH 8,2, 150 mM de NaCl, pHix (5 mg/ml de pentaclorofenol en etanol al 95% (úsese como 10.000x, o 3-4 gotas por litro) Sigma).

Conjugación de un anticuerpo con FITC

FITC es una pequeña molécula orgánica, y se conjuga típicamente a proteínas vía aminos primarias (es decir, lisinas) de una inmunoglobulina. Habitualmente, a cada anticuerpo se conjugan entre 3 y 6 moléculas de FITC; mayores conjugaciones pueden dar como resultado problemas de solubilidad así como la extinción interna (y brillo

reducido). De este modo, un anticuerpo se conjugará habitualmente en varias reacciones paralelas a diferentes cantidades de FITC, y los reactivos resultantes se compararán para determinar el brillo (y pegajosidad de fondo), para elegir la relación óptima de conjugación. Toda la conjugación se puede llevar a cabo en alrededor de medio día. La molécula de fluoresceína reactiva, isotiocianato de fluoresceína, es inestable. Una vez que se ha roto un vial y se solubiliza el FITC, se debería de usar inmediatamente. Puesto que viales individuales de FITC contienen suficiente material para ~100 mg de anticuerpo, es económico realizar múltiples conjugaciones con FITC en el mismo día.

1. Preparación del anticuerpo

Dialícese o intercámbiese el anticuerpo en una columna en 500 mM de carbonato, pH 9,5. Mídase la concentración de anticuerpo tras el equilibrado en tampón (para IgG, 1 mg/ml tiene una A_{280} de 1,4). Si la concentración de anticuerpo es menor que 1 mg/ml, la conjugación será probablemente subóptima. Si es necesario, dilúyase el anticuerpo hasta una concentración de 4 mg/ml.

2. Conjugación covalente

Disuélvanse 10 mg (todo el contenido de 1 vial; no es necesario pesarlo) de FITC (Molecular Probes) en DMSO anhidro inmediatamente antes del uso. Añádase FITC para dar una relación de 40-80 μg por mg de anticuerpo; mézclese inmediatamente. Envuélvase el tubo en papel metálico; incúbase y hágase girar a temperatura ambiente durante 1 hora. Elimínese el FITC sin reaccionar, e intercámbiese el anticuerpo en 500 mM de carbonato, pH 9,5, mediante filtración en gel o diálisis.

3. Caracterización del conjugado

Determinése la concentración de proteína y F/P midiendo la absorbancia a 280 y 495 nm. IgG: 1 mg/ml tiene una $A(280)$ de 1,4; $M_w = 150.000$. IgM: 1 mg/ml tiene una $A(280)$ de 1,2; $M_w = 900.000$. Fluoresceína: 1 mM tiene una $A(495)$ de 68 y una $A(280)$ de 11,8. Los valores de F/P de 3-10 son probablemente óptimos para cualquier IgG particular. Concentración de proteína:

$$\text{IgG (mg/ml)} = [A(280) - 0,31 * A(495)]/1,4$$

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

relación F/P:

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

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

Detección mediante análisis de FRET

Se obtiene una muestra de médula ósea procedente de un paciente con ALL, y se aíslan los leucocitos según procedimientos estándar. Los leucocitos se marcan con dos marcadores de la superficie celular, para definir un subconjunto de leucocitos vía características inmunofenotípicas. Se usaron anticuerpo monoclonal conjugado con FITC anti-CD19 humano (FITC-CD19) y anticuerpo monoclonal conjugado con PE anti-CD10 humano (PE-CD10). Las células se fijaron entonces según procedimientos estándar, por ejemplo en paraformaldehído al 1%, para conservar la integridad de la célula y su contenido. La membrana celular se permeabiliza usando un detergente tal como saponina, para hacer accesible el interior celular al conjunto de sondas. Las células se marcan durante 1 hora a 4 grados Celsius en la oscuridad con una mezcla que contiene un conjunto de sondas según la invención (0,1 a 0,3 microgramos/ml de cada sonda), que comprende un anticuerpo conjugado con biotina marcada con Cy3 frente al motivo de hélice-bucle-hélice de TEL, y un anticuerpo conjugado con biotina marcada con Cy5 frente al dominio Runt de AML1. Tras lavar las células para eliminar la sonda no unida, las células se incuban con avidina no marcada, para inducir una yuxtaposición suficientemente cercana y estable de los dos anticuerpos diferentes. Las células se analizan entonces en un citómetro de flujo. En la Figura 4 se muestran los resultados. El panel A muestra la evaluación de la proteína de fusión TEL-AML1 en células B-ALL precursoras obtenidas de un paciente en el momento del diagnóstico. Las células blastocíticas ALL se confinan primero en base a sus características de dispersión de la luz (dispersión directa frente a dispersión lateral). Después, se confinan los blastocitos positivos a CD19 (FL1 frente a dispersión lateral). La presencia de la proteína de fusión TEL-AML1 es fácilmente detectable en el subconjunto de células CD19+/CD10+ ALL. En el panel B, se muestran análisis similares del mismo paciente después de un protocolo de terapia de cinco semanas para evaluar la eficacia del tratamiento. Sólo el 3% de los blastocitos CD10+ son positivos para la proteína de fusión TEL-AML1, es decir, sólo 0,2% de leucocitos totales. La detección de tal frecuencia baja de células positivas a TEL-AML1 (enfermedad residual mínima) no se ha demostrado antes.

Se ha usado FacsCalibur para llevar a cabo las medidas de FRET usando Cy3 y Cy5 como par donante/aceptor. La excitación de 488 nm no es óptima para Cy3 (sería mejor 543), 632 es óptima para Cy5, y con este montaje se pudieron obtener buenas curvas de distribución de FRET razonables (realmente son mejores que las obtenidas con el par FITC/TRITC, debido a que la autofluorescencia es menos problemática). Además, se pudo usar la banda 488-520 para la corrección de autofluorescencia en una base de célula a célula. La adquisición y análisis de datos se llevó a cabo usando el software Cell Quest Pro.

Referencias

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds), World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours 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, Meeuwse 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. L. 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.

REIVINDICACIONES

- 1.-Un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda de FRET para la detección de una proteína de fusión, proteína de fusión la cual comprende un primer sitio diana y un segundo sitio diana situados en lados opuestos de la región de fusión de dicha proteína de fusión, caracterizado porque:
 - 5 a) la primera sonda (i) comprende un dominio que se une específicamente al primer sitio diana de la proteína de fusión, (ii) está provisto de al menos un primer grupo reactivo, y (iii) está provisto de un primer colorante de FRET;
 - b) la segunda sonda (i) comprende un dominio que se une específicamente al segundo sitio diana de la proteína de fusión, (ii) está provista de al menos un segundo grupo reactivo, y (iii) está provista de un segundo colorante de FRET;
 - 10 en el que
 - c) para evitar la autoasociación de las sondas, los grupos reactivos en la primera sonda no interaccionan directamente con la segunda sonda, y los grupos reactivos en la segunda sonda no interaccionan directamente con la primera sonda;
 - 15 d) las dos sondas no interaccionan entre sí excepto que se añada una sustancia formadora de puente que reacciona con el primer y segundo grupo reactivo;
 - e) al añadir la sustancia formadora de puente, los colorantes de FRET se llevan a una distancia de 100 Angstrom entre sí, permitiendo de ese modo la transferencia de energía y la detección de sondas yuxtapuestas.
- 20 2.-Un conjunto según la reivindicación 1, en el que al menos una sonda está provista de una multiplicidad de grupos reactivos.
- 3.-Un conjunto según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha sonda es un anticuerpo o un fragmento de unión funcionalmente equivalente al mismo.
- 4.-Un conjunto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos uno de dichos colorantes es un fluorocromo.
- 25 5.-Un conjunto según la reivindicación 4, en el que dicho fluorocromo se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), Rojo de Tejas (TR), R-ficoeritrina (R-PE), alofocianina (APC), miembros de las ficobiliproteínas, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, colorantes de cianina, colorantes de Alexa Fluor, conjugados en tándem de estos fluorocromos, y colorantes de nanopartículas semiconductoras.
- 30 6.-Un conjunto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho grupo reactivo comprende biotina.
- 7.-Un conjunto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la sustancia formadora de puentes comprende avidina o estreptavidina.
- 8.-Un kit de diagnóstico para la detección de proteínas de fusión en una célula, que comprende un conjunto de sondas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9.-Un método in vitro para detectar la presencia de una proteína de fusión en una célula, en el que la proteína de fusión comprende un primer sitio diana y un segundo sitio diana situados en lados opuestos de la región de fusión de dicha proteína de fusión, comprendiendo dicho método:
 - 40 (i) poner en contacto una muestra que comprende una célula con un conjunto de al menos una primera y una segunda sonda de FRET según las reivindicaciones 1-8, en condiciones que permitan la unión de dichas sondas a dicha proteína de fusión;
 - (ii) añadir la sustancia formadora de puentes; y
 - (iii) detectar la yuxtaposición de dichas sondas vía FRET.
- 10.-Un método según la reivindicación 9, que incluye adicionalmente la etapa de teñir dicha muestra para al menos un marcador celular para definir una población celular diana, comprendiendo el método poner en contacto dicha muestra con un compuesto capaz de unirse selectivamente a dicho marcador celular.
- 45 11.-Un método según la reivindicación 10, en el que dicho marcador celular es un antígeno del agrupamiento de diferenciación (CD).
- 12.-Un método según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que dicha proteína de fusión es una proteína de fusión específica de tumor.
- 50

13.-Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la señal de FRET se detecta mediante citometría de flujo, permitiendo de ese modo la detección a nivel de una sola célula.

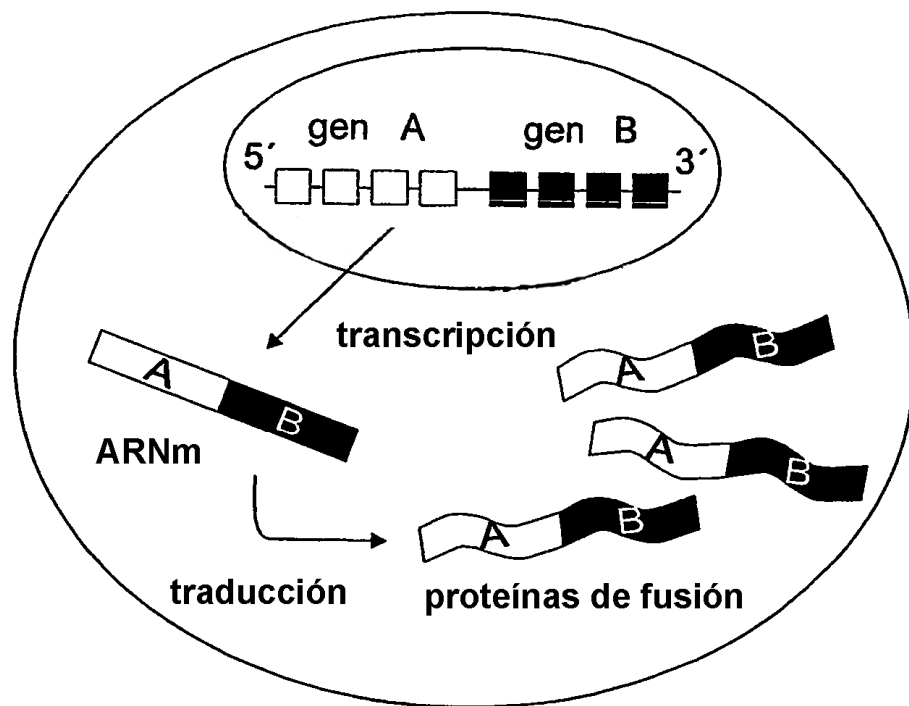


Figura 1

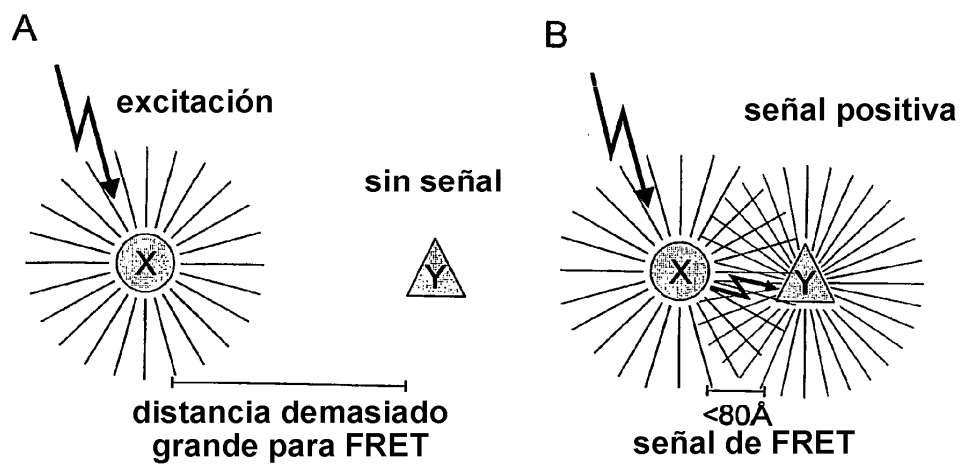


Figura 2

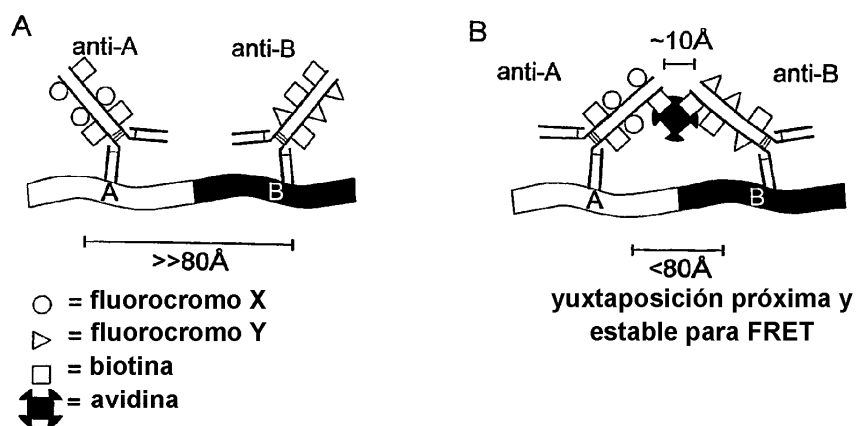
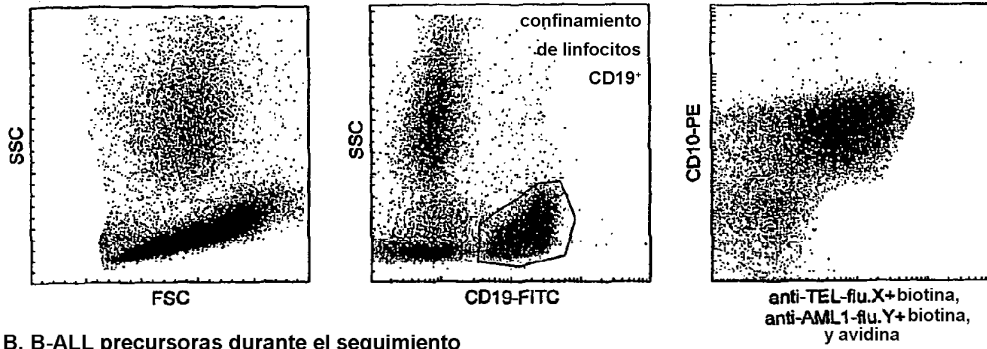


Figura 3

A. B-ALL precursoras en el diagnóstico



B. B-ALL precursoras durante el seguimiento

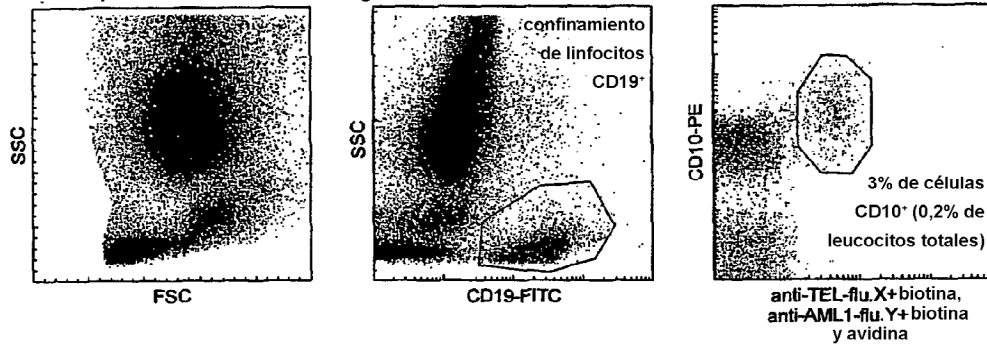


Figura 4