



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 900**

51 Int. Cl.:
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03776064 .2**
86 Fecha de presentación : **06.11.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1561114**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.08.2005**

54 Título: **Sondas FRET y métodos para detectar moléculas de interacción.**

30 Prioridad: **07.11.2002 EP 02079667**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

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

72 Inventor/es:
Van Dongen, Jacobus, Johannes, Maria y
Staal, Frank, Jakob, Theodor

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 306 900 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

Sondas FRET y métodos para detectar moléculas de interacción.

5 La invención se refiere al campo de la detección de las proteínas interaccionantes y otras moléculas íntimamente asociadas. Más específicamente, la invención se refiere a la evaluación de las interacciones íntimas entre macromoléculas a nivel de célula individual. La reciente abundancia de datos de las secuencias del genoma ha necesitado que la proteómica sistemática descifre las redes de proteínas codificadas que dictan la función celular. Estas incluyen la interacción célula-célula, la activación celular, el ciclo celular, las rutas de señalización, la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, el desarrollo y otras muchas funciones celulares. Las etapas iniciales en la elucidación de la función de un producto génico no caracterizado, esto es, una proteína novedosa, a menudo implican el estudio de su interacción con otras proteínas. Si bien la elucidación de una red de proteínas proporciona una abundancia de información en cuanto a los representantes, la percepción de las interacciones entre las moléculas individuales es esencial para comprender la contribución de cada molécula a una red molecular.

15 Los estudios de co-localización se emplean a menudo para controlar la proximidad de una proteína de interés a otra proteína de interés. Los datos de co-localización también son útiles como medio de evaluación de la información de proteínas inferida a partir de datos genéticos p. ej., apoyar o refutar supuestas interacciones de proteínas sugeridas por ejemplo a partir de un análisis de dos híbridos de levadura. La co-localización de las proteínas intracelulares se puede evaluar mediante el uso de anticuerpos marcados diferencialmente específicamente reactivos con proteínas endógenas de interés que pueden ser detectadas visualmente mediante microscopía de fluorescencia por medio de inmunofluorescencia. A este fin, se tratan células fijadas con un grupo de anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés, y después con un grupo de anticuerpos secundarios conjugados con colorante fluorescentes. También se pueden utilizar anticuerpos conjugados directamente con un colorante fluorescente. Esos colorantes deben diferir en la longitud de onda de excitación y emisión, de manera que puedan ser excitados independientemente y observados con canales fluorescentes separados. Alternativamente, los genes que codifican las proteínas de interés pueden ser fusionados con un gen informador que codifica una proteína informada, como la proteína verde fluorescente (GFP), o etiquetadas con un epítipo, tal como Myc o HA. Los informadores y las etiquetas epitópicas se fusionan rutinariamente a los extremos N o C de los genes diana. Adicionalmente se pueden utilizar colorantes específicos para membranas o ácidos nucleicos para revelar los orgánulos celulares, p. ej., se puede visualizar el núcleo mediante tinción del ADN con DAPI. Las imágenes se recogen generalmente en un microscopio confocal que asegura que las proteínas observadas están en el mismo plano focal, y por lo tanto la co-localización, si la hubiera, es real. La co-localización es revelada por un solapamiento de colores.

25 No obstante, se debe enfatizar que la resolución de la microscopía confocal solamente permite detectar una co-localización global de proteína y no demuestra necesariamente una interacción íntima. Los colores solapantes no implican necesariamente proteínas interaccionantes, esto es posicionamiento de proteínas en una distancia muy corta, por ejemplo en el intervalo de 3 a 100 Ångstroms. Por lo tanto, los estudios de co-localización requieren rutinariamente un análisis suplementario para investigar si las moléculas co-localizadas representan patrones verdaderamente interaccionantes. Las técnicas bioquímicas normalizadas típicas para evaluar supuestas moléculas interaccionantes incluyen experimentos de co-inmunoprecipitación, análisis de afinidad “arrastrar y colocar” (pull down) y cromatografía de afinidad.

35 La co-localización de moléculas de la superficie celular, p. ej. proteínas A y B, también se puede determinar por medio de los denominados experimentos de formación de parche/caperuza (patching/capping). Brevemente, tras la adición de un ligando multivalente para la proteína A a las células viables, un grupo o parche de moléculas de proteína A se reúne en la membrana. Si la célula está viva y activa metabólicamente, se forman parches que se pueden reunir adicionalmente en una caperuza en un procedimiento denominado “formación de caperuza” (“capping” en sus siglas en inglés), que se produce preferiblemente a 37 grados Celsius. Los parches/caperuza pueden ser teñidos mediante procedimientos de tinción con fluorescencia indirecta. Con posterioridad, las células pueden ser contratendidas a 4 grados Celsius (para retener los parches/caperuza) con un anticuerpo conjugado con colorante contra la proteína B para evaluar si la proteína B se ha movido a la vez, esto es está co-localizada con la proteína A que ha formado el parche/caperuza o si la proteína B todavía está difusamente distribuida sobre la superficie celular¹. Aunque este método funciona en la práctica para evaluar la co-localización de proteínas de membrana superficiales, lleva mucho tiempo, necesita experiencia y solamente puede ser evaluada mediante microscopía con colorante, no mediante citometría de flujo. Además, los procedimientos microscópicos no son adecuados como método de alto rendimiento para la evaluación de moléculas interaccionantes.

45 Un método particularmente elegante para detectar las moléculas íntimamente reaccionantes implica la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). En la FRET, un colorante (denominado “donador”) transfiere, tras la excitación por una fuente de luz, su energía a otro colorante (denominado “aceptor”). La transferencia de energía se produce cuando el espectro de emisión del colorante donador se solapa significativamente con el espectro de excitación del aceptor. La yuxtaposición suficientemente íntima de los dos colorantes, generalmente más próximos que 100 Ångstroms, pero preferiblemente más próximos que 50 Ångstroms, es esencial para la transferencia de energía entre el par donador/aceptor. Un Ångstrom, una unidad métrica de longitud, es igual a 0,1 nanómetros o 10⁻¹⁰ metros. La FRET se basa normalmente en la interacción entre colorantes donadores y aceptores que son ambos fluorescentes. No obstante, la FRET también puede ser detectada mediante la extinción de la fluorescencia del donador utilizando un colorante aceptor no fluorescente. Los colorantes aceptores no fluorescentes son ventajosos en general debido a

que eliminan la fluorescencia del fondo que resulta de la excitación del aceptor directo. En la presente invención, es posible controlar sondas yuxtapuestas en moléculas interaccionantes utilizando un colorante donador fluorescente y un colorante aceptor no fluorescente. La unión específica de un grupo de sondas a moléculas no interaccionantes producirá una señal de fluorescencia basal. Tras la interacción íntima de las moléculas, la FRET entre las sondas extinguirá la fluorescencia del donador. En lugar de medir un incremento en la fluorescencia del aceptor, el uso de un aceptor no fluorescente implica medir un descenso en la fluorescencia del donador. Generalmente, la detección de una disminución de la señal es menos sensible en comparación con la detección de un aumento de la señal. Por lo tanto, un método de acuerdo con la invención se pone en práctica preferiblemente utilizando un donador fluorescente y un colorante aceptor fluorescente.

La eficacia de la transferencia de energía FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el donador y el aceptor. La FRET, descrita previamente por Förster, se ha vuelto extremadamente importante para la biología celular moderna debido a que la FRET permite medir las distancias entre moléculas a una escala de unos pocos nanómetros. Esto está bastante por debajo del límite de resolución de la microscopía óptica de campo lejano moderna, que en la actualidad está en aproximadamente 100 nm. La tecnología FRET ha sido utilizada para la detección de diversas (bio)moléculas individuales. Por ejemplo, en el documento US 6.235.535 se describe un método de inmunoanálisis basado en la fluorescencia para la detección de un analito en una muestra biológica. El método se basa en la capacidad de un analito multivalente (antígeno) para inducir la agregación de moléculas receptoras idénticas (anticuerpos) marcados con un fluoróforo, cuyas moléculas son inmovilizadas sobre un elemento móvil todavía libre en una membrana lipídica. La agregación inducida por antígenos de los receptores hace que tenga lugar la FRET. Asimismo en el documento US 2002/0081617, se inmovilizan anticuerpos, en este caso sobre cuentas, dirigidos al mismo epítipo pero marcados con un donador de colorante aceptor. Tras la adición de un analito (antígeno) de interés, el analito funciona como puente y sitúa un par de anticuerpos en íntima proximidad entre sí lo que conduce a la FRET. De este modo, el documento US 6.235.535 y el documento US 2002/0081617 hacen referencia ambos a la detección o medición de un analito utilizando sondas conjugadas con colorante, inmovilizadas y métodos de detección basados en FRET. Puesto que los grupos de sondas del documento US 6.235.535 y del documento US 2002/0081617 están dirigidas a una única molécula o epítipo molecular, estos no son adecuados esencialmente para detectar distintas moléculas interaccionantes.

La extrema sensibilidad del procedimiento FRET sobre la distancia entre las moléculas hace de él una herramienta muy útil para la resolución de transposiciones de proteínas intracelulares y dinámicas de proteína. La presencia de FRET indica una interacción intermolecular puesto que es observable solamente para una distancia de fluoróforos en una escala de nanómetros. Esto implica en particular que la simple co-localización de dos moléculas, p. ej. proteínas, no es suficiente para producir una transferencia de energía. La FRET es una técnica que puede dar respuestas claras, inequívocas a cuestiones a cerca de interacciones proteína-proteína. La mediciones mediante FRET se pueden utilizar para determinar las interacciones de proteínas en la superficie celular.² La "revolución verde" iniciada por la introducción de la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* en los últimos desarrollos de mutantes con GFP que poseen diferentes propiedades espectrales ofreció la posibilidad de una expresión simultánea de diferentes proteínas, etiquetadas artificialmente con dominios donadores y aceptores fluorescentes en la misma célula.^{3,4} Esto permitió la medición de sus interacciones mediante FRET. A menudo se utiliza la combinación de proteínas etiquetadas con Proteína Fluorescente Cianica (CFP) (donador) y Proteína Fluorescente Amarilla (YFP) (aceptor). Este par FRET se puede utilizar para controlar la proximidad de las dos etiquetas fluorescentes unidas en 3-6 nm. La expresión simultánea de proteínas etiquetadas con CFP e YFP se ha utilizado con éxito para analizar los cambios a corto plazo en las interacciones proteína-proteína, p. ej., oligomerización, co-localización, formación de complejos, activación de quinasas y mapeo de actividades enzimáticas en células vivas. También se utilizó la tecnología FRET en un método de microscopía por visualización de la vida media de fluorescencia altamente específica (FLIM) para controlar la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células. La fosforilación de EGFR se controló utilizando EGFR etiquetado con GFP y anticuerpos anti-fosfotirosina conjugados con Cy3.⁵

Aunque las proteínas etiquetadas fluorescentemente han demostrado ser muy útiles, tienen limitaciones, tales como su tamaño significativo (>200 aminoácidos). Asimismo, el plegamiento global y la estructura terciaria de una proteína diana pueden ser diferentes de los de la proteína no etiquetada, nativa. Esto puede dar como resultado diferentes interacciones erróneas con otras moléculas. Sacar conclusiones con respecto a las interacciones proteína-proteína estudiadas basándose en los datos entre pares de proteínas etiquetadas, así como realizar comparaciones con las funciones celulares normales en las células vivas, se justifica solamente si las proteínas etiquetadas se comportan de un modo similar a las correspondientes proteínas de tipo salvaje endógenas. Por ejemplo, la proteína etiquetada fluorescentemente expresada debe revelar la misma distribución intracelular que la proteína de tipo salvaje; la expresión de la proteína etiquetada *per se* no debe inducir ni inhibir las funciones celulares y la proteína etiquetada expresada en la célula no debe crear una señal FRET de fondo significativa p. ej. debido a la expresión en exceso, el desplazamiento del pH etc. Otra desventaja principal del uso de proteínas etiquetadas recombinantes descansa en el hecho de que requiere la co-transfección de uno o varios constructos quiméricos de interés en una célula y la selección de una célula que muestra una expresión adecuada de un constructo para producir una proteína funcional. Obviamente, semejante sistema no permite la detección de una proteína endógena y por lo tanto no se puede utilizar para evaluar moléculas interaccionantes endógenas. Un informe describe el uso de la tecnología FRET para controlar la dimerización inducida por ligando de un receptor de la superficie celular endógeno por medio de un anticuerpo específico que estaba conjugado directamente o bien con el colorante donador FITC o bien con el colorante aceptor Cy3.⁶ La capacidad de un ligando para inducir la dimerización del receptor se evaluó mediante análisis por citometría de flujo de FRET entre FITC y Cy3. Se utilizó un par de productos conjugados con anticuerpos para estudiar las proteínas de la superficie

ES 2 306 900 T3

celular en linfocitos humanos; la cadena CD8 alfa detectada por pares de anticuerpos frente a los diferentes epítomos; el último antígeno 4 (VLA4), una integrina $\alpha_4\beta_1$ heterodimérica, fue detectada por medio de FRET entre pares de productos conjugados de anticuerpos específicos para β_1 de la integrina (CD29) o α_4 de la integrina (CD49d); la asociación del receptor de las células T (TCR) con un ligando antigénico soluble fue detectada por medio de FRET cuando se utilizaron anticuerpo anti-TCR y complejos de MHC de clase I/péptido. En otro informe más, se utilizó la tecnología FRET mediada por anticuerpos para medir la interacción del receptor c-kit con su ligando SCF (factor de célula pluripotencial)⁷ (“stem cell factor” en sus siglas en inglés). Hasta aquí, no se ha aplicado la tecnología FRET mediada por anticuerpos para detectar interacciones proteína-proteína intracelulares.

La tecnología FRET también se ha aplicado a la detección de una interacción proteína-ADN basándose en el denominado principio de unión indirecta. Por ejemplo, se utilizó para controlar la interacción entre la subunidad p65 del factor de transcripción, NF-kappaB y su sitio de unión al ADN. NF-kappaB tiene una gran importancia en el sector farmacéutico debido a su capacidad para regular numerosos genes implicados en diversas respuestas inmunitarias e inflamatorias. Como tal NF-kappaB ha sido implicado en numerosos estados de enfermedad incluyendo diversas infecciones virales (HIV), artritis y cáncer. Se deja que un anticuerpo anti-GST marcado con Cy3 (aprox. 7-12 colorantes por molécula) interactúe con una proteína de fusión GST purificada por afinidad de p65 y GST (p65GST). Se marcó individualmente una secuencia de ADN de doble hebra (ADNdh) que contiene el sitio de unión a NF-kappaB con Cy5 en el extremo 5' de la secuencia codificante. Después ésta se incubó con un anticuerpo marcado con Cy3 y p65GST. La reacción se realizó en presencia o ausencia de ADNdh competidor no específico o específico no marcado. En ausencia de cualquier competidor, la unión mediante p65-GST dio como resultado FRET entre las moléculas donadoras Cy3 sobre anti-GST y la molécula aceptora Cy5 sobre el ADNdh.

De este modo, sería ventajoso poseer un método que permitiera la detección de interacciones entre proteínas intracelulares endógenas y/u otras moléculas tales como ácidos nucleicos, lípidos y/o radicales carbohidrato. Particularmente estimulante es la detección de interacciones intermoleculares a nivel de células individuales.

La presente invención proporciona la revelación de que las sondas conjugadas con colorante, p. ej. anticuerpos, se pueden utilizar para detectar moléculas endógenas interaccionantes cuando estas sondas están suficientemente yuxtapuestas. Se proporciona un grupo de al menos una primera y una segunda sondas moleculares, cada sonda provista de un colorante donde dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía; estando provistas dichas sondas de un grupo reactivo capaz de unirse a una sustancia formadora de puentes que permite yuxtaponer dichas al menos una primera y segunda sondas donde dicho grupo reactivo permite modular la yuxtaposición de dichas sondas de manera que haya un aumento de la probabilidad de transferencia de energía entre ellas.

De acuerdo con la invención, una sonda molecular es capaz de unirse específicamente a una molécula interaccionante de interés por medio del denominado dominio de unión. Después de la unión de al menos una primera y una segunda sondas a una molécula por medio del dominio de unión, se puede utilizar un grupo reactivo para modular la yuxtaposición de las sondas. El grupo reactivo no tiene o tiene una tendencia mínima para competir con el dominio de unión para unirse a una molécula interaccionante. Junto con esto, se puede distinguir el grupo de sondas de la invención de los grupos de sondas de anticuerpos conocidos que están agrupadas o yuxtapuestas por la mera unión a una molécula o complejo antigénicos. El grupo reactivo permanece preferiblemente disponible modulando la organización espacial de las sondas yuxtapuestas después de que las sondas se unan a las moléculas interaccionantes.

Adicionalmente, la invención proporciona un método para detectar al menos dos moléculas interaccionantes en una célula utilizando un grupo de al menos una primera y una segunda sondas moleculares, cada sonda capaz de unirse a una molécula diferente, cada sonda provista adicionalmente de un colorante donde dichos colorantes juntos permiten una transferencia de energía, estando provistas dichas sondas de un grupo reactivo que permite modular la yuxtaposición de dicha al menos primera y dicha segunda sondas de manera que haya un incremento de probabilidad de transferencia de energía entre dichos colorantes, que comprende proporcionar un grupo 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 dichas moléculas interaccionantes, eliminar cualquier sonda no unida y cualquiera unida no específicamente y detectar la yuxtaposición de dichas sondas por medio de FRET para determinar la interacción entre dichas moléculas.

El método proporcionado es especialmente adecuado para evaluar la íntima interacción entre proteínas intracelulares. No obstante, el método descrito también se puede aplicar para detectar una interacción entre otras clases de moléculas, como una interacción proteína-ácido nucleico, siempre que se utilice una sonda adecuada. Una sonda adecuada es una sustancia capaz de unirse específicamente a una molécula específica. Una molécula específica puede ser una proteína, ácido nucleico, lípido, carbohidrato. Un ácido nucleico puede ser ADN o ARN. Una sonda puede ser un anticuerpo convencional (poli- o monoclonal) o sintético o un fragmento de unión funcionalmente equivalente a este, tal como Fab', Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla. Una sonda de acuerdo con la presente invención comprende de hecho cualquier tipo de molécula de unión capaz de unirse específicamente o de hibridar con una molécula específica tal como una proteína, un ácido nucleico, una molécula lipídica, un radical carbohidrato u otra clase de biomoléculas.

Por ejemplo, la invención se puede poner en práctica con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar con una secuencia de ácido nucleico específica. Se pueden utilizar en la invención diversas sondas de ácido nucleico para identificar elementos genéticos. Estas incluyen sondas tradicionales tales como hebras pequeñas de ácido desoxirri-

ES 2 306 900 T3

bonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN) así como un ácido peptidonucleico (PNA). Un PNA tiene que ver, pero es distinto de, ADN. La estructura química de un PNA difiere de la del ADN en que un esqueleto de tipo peptídico, en lugar de un esqueleto de fosfato, soporta las bases del ácido nucleico. Las sondas de ácido nucleico que se van a utilizar de acuerdo con la invención se pueden seleccionar basándose en el análisis de la secuencia de las regiones de ácido nucleico que se van a investigar. Las sondas pueden ser sintetizadas y marcadas de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. La unión acertada de una sonda con una región del ácido nucleico de una muestra identifica el segmento génico.

En la presente invención se proporciona un grupo de al menos una primera y una segunda sondas provistas de un colorante que permite la transferencia de energía, cada sonda provista adicionalmente de un grupo reactivo que permite yuxtaponer dicha primera y segunda sondas. En el presente contexto, el término colorante hace referencia a un sustituyente que, conjuntamente con otro colorante, puede ser utilizado para la transferencia de energía p. ej. análisis FRET. Se prefiere que al menos uno de dichos colorantes sea un fluorocromo. Para lograr la transferencia de energía por resonancia, una molécula de colorante donador debe absorber luz y transferirla por medio de resonancia de los electrones excitados a una segunda molécula de colorante, el aceptor. Para que la transferencia de energía tenga lugar, la longitud de onda de emisión de fluorescencia del donador debe ser inferior a la longitud de onda de excitación del aceptor; esto es, el procedimiento debe estar energéticamente “en declive”. Mientras FRET se basa normalmente en la interacción entre colorantes donadores y aceptores que son ambos fluorescentes, también se pueden utilizar colorantes aceptores no fluorescentes. Estos pueden resultar ventajosos a veces debido a que eliminan la fluorescencia de fondo que resulta de la excitación directa (esto es, no sensibilizada) del aceptor. Los ejemplos de los fluorocromos adecuados son las marcas de fluoresceína, p. ej. 5-(y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluorescein)-5-(y 6)-carboxamido-hexanoico e isotiocianato de fluoresceína, colorantes Alexa Flúor, colorantes de cianina tales como Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, cumarina opcionalmente sustituida, R-ficoeritrina, aloficoeritrina, Rojo Texas y Rojo Princeton así como productos conjugados de R-ficoeritrina y, p. ej. Cy5 o Rojo Texas. Véase también www.probes.com/handbook/tables/1570.html. Otros colorantes de interés son los colorantes de puntos cuánticos, que se encuentran en una paleta de colores casi ilimitada.

Los ejemplos de los colorantes adecuados son aquellos adecuados para el análisis mediante citometría de flujo convencional. Los pares FRET que pueden ser utilizados para la detección por la mayoría de los citómetros de flujo convencionales son comentados p. ej. por Szollosi *et al.*⁸ Las combinaciones de fluorocromos preferidas para poner en práctica la presente invención comprenden los colorantes utilizados en los productos conjugados en tándem clásicos, también referidos como duocromos⁹.

En una realización preferida de la invención, se pone en contacto una muestra con dos anticuerpos, uno contra la proteína A y el otro contra la proteína B para controlar una interacción entre la proteína A y la proteína B. Un anticuerpo está marcado con un colorante donador FRET y el otro con un colorante aceptor FRET. Solamente cuando la proteína A está en íntima proximidad con la proteína B, p. ej. cuando ambas son parte de un complejo de proteínas más grande, los dos anticuerpos se aproximan lo suficientemente cerca (“yuxtaponen”) lo que permite al par donador/aceptor inducir una señal de fluorescencia FRET detectable. Sin embargo, un anticuerpo completo es una molécula de proteína en forma de una gran Y, 150 kDa de tamaño, formada por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. Debido a la longitud de la molécula de anticuerpo (300 a 400 Angstroms) y a la flexibilidad de la región bisagra, las moléculas de anticuerpo pueden salvar una distancia relativamente grande. La flexibilidad de un anticuerpo puede disminuir la probabilidad de la transferencia de energía entre un par de colorantes que están conjugados con sondas yuxtapuestas de anticuerpos. Asimismo, el tamaño de la sonda o el colorante podría interferir en la transferencia de energía ejerciendo efectos estéricos negativos. Además, cuando se prepara un producto conjugado de colorantes, como una sonda fluorescente, en general no es posible controlar el sitio de la conjugación. En el caso de la conjugación de anticuerpos, un radical colorante puede unirse 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 eficacia de la transferencia de energía, esto es, los colorantes unidos a sondas no precisan necesariamente estar a dentro de una distancia de transferencia de energía entre sí. Cuando se evaluó el par FRET PE/APC para su uso en FRET mediada por anticuerpos mediante análisis de proteínas de la superficie celular interaccionantes, se detectó FRET en todos los casos aunque la eficacia de la transferencia de energía observada fuera siempre menor del 10%. Posiblemente esto se debió a los efectos estéricos asociados con el tamaño y la estructura de PE y APC. De este modo, mientras una íntima yuxtaposición de las sondas FRET es un requerimiento para la transferencia de energía entre un par donador/aceptor, puede no ser siempre suficiente para lograr una transferencia de energía eficaz entre los colorantes unidos a dichas sondas yuxtapuestas p. ej. entre anticuerpos conjugados con fluorocromos en moléculas interaccionantes o en moléculas que son parte de un complejo.

La invención proporciona ahora una solución para este problema proporcionando la intuición de que la yuxtaposición de las sondas puede ser estabilizada y/o potenciada proporcionando a las sondas un grupo reactivo. Se proporciona un grupo de al menos una primera y una segunda sonda molecular, proporcionada cada sonda con un colorante donde dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía; comprendiendo dichas sondas un grupo reactivo que permite la yuxtaposición de dichas al menos primera y segunda sondas donde dicho grupo reactivo permite modular la yuxtaposición de dichas sondas de manera que haya una mayor probabilidad de transferencia de energía entre ellas. El uso de semejante grupo de sondas produce un aumento de la sensibilidad de detección de las sondas yuxtapuestas midiendo la transferencia de energía en comparación con el uso de sondas sin un grupo reactivo. En el presente contexto, el término “grupo reactivo” hace referencia a un radical que permite modular la organización espacial de los colorantes FRET sobre las sondas de manera que haya un incremento en la probabilidad de que se produzca una transferencia de

ES 2 306 900 T3

energía y/o un incremento en la eficacia de la transferencia de energía. La organización espacial hace referencia tanto a la distancia entre los colorantes como a su orientación relativa. La modulación de la organización espacial incluye ajustar y estabilizar la organización espacial de los colorantes. Una de las principales condiciones para que se produzca la transferencia de energía es que las moléculas donadora y aceptora deben estar en íntima proximidad, típicamente 2-100 Å. En una realización preferida, un grupo reactivo permite poner dichos colorantes a una distancia de 100 Å entre sí, más preferiblemente a 50 Å entre sí pero muy preferiblemente a una distancia de 20 Å entre sí. Por lo tanto se prefiere que el grupo reactivo sea pequeño, más pequeño de 10 kiloDalton (kD), mejor más pequeño de 5 kDa, incluso mejor más pequeño de 2 kDa o lo mejor más pequeño de 1 kDa.

Un grupo reactivo puede ser capaz de modular sondas yuxtapuestas (sondas unidas por medio de sus dominios de unión a moléculas interaccionantes) de manera que haya un aumento de probabilidad de transferencia de energía entre los colorantes interaccionando directamente con otra sonda. Por ejemplo, un grupo reactivo de una primera sonda se une a una parte de una segunda sonda yuxtapuesta para formar un complejo estable entre dichas sondas en una orientación espacial que es favorable para que se produzca FRET. Como se ha mencionado antes con respecto al sitio de conjugación del colorante, a menudo no es posible modificar selectivamente una sonda con un grupo reactivo en un sitio definido. El sitio de la modificación se determina principalmente mediante la presencia y accesibilidad de un cierto resto por medio del cual un grupo reactivo es conjugado con una sonda, p. ej. por medio de aminas primarias o por medio de grupos tiol. De este modo, una sonda de anticuerpo puede contener un grupo reactivo en la región constante y/o la región variable de la inmunoglobulina. Es concebible que no todos los sitios son igualmente adecuados para interaccionar con una segunda sonda p. ej. debido a impedimentos estéricos. Por lo tanto, se prefiere que una sonda esté provista de una multiplicidad de grupos reactivos para aumentar estadísticamente su capacidad para interaccionar con otra sonda.

Se proporciona en la presente memoria un método para detectar al menos dos moléculas interaccionantes en una célula utilizando un grupo de al menos una primera y una segunda sondas moleculares, cada sonda capaz de unirse a una molécula diferente, cada sonda provista adicionalmente de un colorante donde dichos colorantes juntos permiten una transferencia de energía, provistas dichas sondas de un grupo reactivo que permite modular la yuxtaposición de dichas al menos primera y segunda sondas de manera que haya un aumento de la probabilidad de transferencia de energía entre dichos colorantes, que comprende: proporcionar un grupo de sondas, proporcionar una muestra que comprende una célula, poner en contacto dicha muestra con dichas sondas en dichas moléculas interaccionantes, eliminar cualquier sonda no unida y unida no específicamente y detectar la yuxtaposición de dichas sondas por medio de FRET para determinar la interacción entre dichas moléculas.

En caso de que una primera sonda se pueda unir directamente con al menos una segunda sonda, se prefiere poner en contacto dicha muestra con cada sonda en etapas consecutivas con procedimientos de lavado intermitentes extensos para evitar la auto-asociación entre sondas. Por ejemplo, se utiliza un grupo de sondas A y B para detectar una interacción entre las moléculas A y B de la muestra. A este fin, se pone en contacto dicha muestra con una sonda A que comprende un grupo reactivo para permitir el reconocimiento y la unión a la molécula A. A continuación, se elimina cualquier sonda A no unida y unida no específicamente mediante etapas de lavado repetidas. Con posterioridad, se pone en contacto dicha muestra con una sonda B específicamente reactiva con la molécula B en condiciones que permitan yuxtaponer la sonda A y B en moléculas interaccionantes A y B. También aquí, se puede eliminar cualquier sonda B no unida y unida no específicamente mediante etapas de lavado repetidas. Un grupo reactivo de la sonda A puede interaccionar con una sonda B yuxtapuesta para modular la orientación espacial de los colorantes presentes en dichas sondas de manera que haya un aumento de la probabilidad de transferencia de energía entre ellos. Aunque este método se puede utilizar para detectar moléculas íntimamente interaccionantes, se debe aclarar que semejante procedimiento, que implica múltiples etapas separadas de contacto y separación, es bastante laborioso y lleva tiempo. Por otra parte, si las sondas son capaces de interaccionar directamente entre sí, se puede esperar una señal de fondo significativa debido, en términos generales, a que las sondas específica se unen a sus moléculas diana independientemente de si estas moléculas interaccionan. En el ejemplo anterior, una sonda A unida a una molécula A no interacciona con la molécula B todavía podría reclutar sonda B y permitir la transferencia de energía entre los colorantes conjugados con las sondas A y B. Asimismo, si no se elimina eficazmente todas la sonda A no unida después de poner en contacto la muestra con la sonda A, se puede producir una interacción no deseada entre las sondas A y B después de poner en contacto dicha muestra con la sonda B. Ambos eventos pueden dar como resultado una señal de transferencia de energía detectable a pesar del hecho de que la sonda B no está yuxtapuesta a la sonda A en las moléculas interaccionantes.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, un grupo reactivo de al menos una primera sonda no es directamente o inmediatamente reactivo con dicha segunda sonda con el fin de evitar la auto-asociación de dichas sondas. Esto también es ventajoso para un reconocimiento óptimo de las moléculas interaccionantes mediante el dominio de unión de cada sonda y para yuxtaponer dichas sondas en dichas moléculas. Por otra parte, evita que se produzca la transferencia de energía prematura entre sondas directamente conectadas o multimerizadas y disminuye la señal de fondo inespecífica. Esto es importante para asegurarse de que la señal de transferencia de energía refleja verdaderamente las sondas yuxtapuestas.

La invención proporciona la intuición de que una sonda que comprende un grupo reactivo que no interacciona directamente con otra sonda para evitar la auto-asociación de dichas sondas, se utiliza ventajosamente en un sistema que comprende una sustancia denominada "formadora de puentes" capaz de mediar una interacción entre dichas sondas. Semejante sistema permite modular la yuxtaposición de dichas sondas de manera que haya un aumento de la probabilidad de transferencia de energía entre los colorantes de dichas sondas a la vez que minimiza la oportunidad

ES 2 306 900 T3

de interacciones inespecíficas y/o prematuras entre las sondas. El uso de un grupo de sondas combinado con una sustancia formadora de puentes tiene algunas ventajas sobre el uso de sondas directamente interaccionantes. Primero, se puede lograr una mejora de la especificidad y una reducción de la tinción de fondo. Después de todo, para que un grupo reactivo ejerza su efecto por medio de una sustancia formadora de puentes, las sondas necesitan estar en íntima yuxtaposición entre sí antes de la adición de dicha sustancia, esto es resultante de la unión de una sonda adyacente a otra sonda sobre moléculas íntimamente interaccionantes. Segundo, el procedimiento es más rápido y más fácil debido a que no se requieren etapas de contacto y lavado separadas para cada sonda individual. De este modo, se permite poner en contacto una muestra con una mezcla de sondas todas juntas en una única acción. Del mismo modo, cualquiera de las sondas no unidas y unidas no específicamente se puede eliminar simultáneamente.

Una sustancia puede ser cualquier clase de compuesto capaz de unirse a o modificar una sonda, un grupo reactivo y/o un colorante para modular la organización espacial de los colorantes sobre sondas yuxtapuestas de manera que sea favorable para la FRET. Dicha sustancia permite poner dichos colorantes a una distancia de 2 a 100 Ångstroms entre sí. Dicha sustancia se añade preferiblemente a una muestra después de la unión de las ondas conjugadas con colorante a moléculas interaccionantes, en una cantidad eficaz para modular la organización espacial de dichos colorantes sobre las sondas yuxtapuestas. Ventajosamente, dicha sustancia se une a un grupo reactivo con una elevada especificidad y una elevada afinidad. Asimismo, se prefiere que semejante sustancia sea relativamente pequeña de manera que la sustancia formadora de puentes afecte sólo mínimamente a la distancia entre un par de colorantes y a la orientación relativa de un par de colorantes.

Es muy preferido, como se ilustra en la presente memoria en la descripción detallada, un grupo de al menos una primera y una segunda sondas moleculares, cada sonda provista de un colorante donde dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía; cada sonda provista de un grupo reactivo. Una sustancia es capaz preferiblemente de unirse, o "formar puentes", al menos con dos grupos reactivos. En una realización preferida, cada sonda de un grupo de sondas está provista del mismo grupo reactivo. Asimismo, cada sonda de un grupo de sondas puede estar provista de un grupo reactivo diferente pero que tiene la misma reactividad. 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 de la invención, una sonda está provista de una multiplicidad de grupos reactivos, como dos o tres o incluso hasta diez grupos reactivos, permitiendo que dicha sonda interaccione con más de una molécula de la sustancia formadora de puentes. Proporcionar a una sonda más de un grupo reactivo aumentará teóricamente la probabilidad de interacción entre dicha sonda y una sustancia formadora de puentes. Además, para facilitar la puesta en práctica de la presente invención, se encuentra disponible en el mercado un grupo reactivo adecuado o un derivado del mismo y se puede unir fácil y eficazmente a una sonda.

De acuerdo con la presente invención, un grupo reactivo particularmente interesante es la biotina, siendo la avidina o la estreptavidina una sustancia formadora de puentes particularmente adecuada. La avidina es una glicoproteína derivada de la clara de huevo con un peso molecular de aproximadamente 68.000 daltons y un diámetro de 8 a 10 Ångstroms. Consiste en cuatro cadenas sub-unitarias idénticas. Una molécula de avidina o estreptavidina se puede unir a cuatro moléculas de biotina. La avidina tiene una afinidad extraordinariamente elevada (constante de afinidad $> 10^{15} \text{ M}^{-1}$) por la biotina. Esta alta afinidad asegura al usuario un complejo rápidamente formado y estable entre la avidina y las sondas marcadas con biotina. La proteína estreptavidina, producida por la bacteria *Streptomyces avidinii*, tiene una estructura muy similar a la de la avidina, y también se une a la biotina íntimamente. A menudo muestra una unión no específica menor, y de este modo se utiliza frecuentemente en lugar de la avidina. Una vez que se forma el complejo biotina-avidina, el enlace es esencialmente irreversible. El sistema biotina-avidina es ampliamente utilizado y se ha demostrado que es muy útil en la detección y localización de antígenos, productos glicoconjugados, y ácidos nucleicos empleando anticuerpos biotinilados, lectinas, o sondas de ácido nucleico. Como se ha mencionado, un grupo reactivo con un tamaño tan pequeño es ventajoso para lograr una corta distancia entre un par de colorantes. La biotina es una vitamina con un peso molecular de solamente 244 daltons. Además, muchas moléculas de biotina se pueden acoplar a una proteína, permitiendo que una sonda biotinilada se una a más de una molécula de avidina. La avidina, la estreptavidina y la biotina se encuentran disponibles a partir de muchas fuentes comerciales. Los diversos procedimientos normalizados para preparar productos conjugados con biotina son conocidos por los expertos en la técnica, la mayoría de los cuales pueden ser completados en un día. Por otra parte, se encuentra disponibles kits de biotinilación comerciales que contienen todos los componentes necesarios para la biotinilación de proteínas.

Si se utiliza un grupo de sondas donde cada sonda está provista de un grupo reactivo diferente, una sustancia adecuada comprende una molécula capaz de unirse al menos a uno de cada uno de los grupos reactivos. Alternativamente, semejante sustancia de unión comprende un complejo de al menos dos moléculas que pueden estar ancladas covalentemente o no covalentemente entre sí, donde cada molécula es capaz de unirse a un grupo reactivo.

Un método de acuerdo con la invención permite la detección de al menos dos moléculas interaccionantes en una célula donde al menos una de dichas moléculas es una sustancia proteínica. En otra realización, al menos una de dichas moléculas es un ácido nucleico. En otra realización más de la invención, al menos una de dichas moléculas es un lípido o un carbohidrato. Por ejemplo, la invención proporciona un método para detectar la interacción de al menos una proteína con al menos un ácido nucleico, tal como una proteína de unión a ADN que se une a una secuencia conformacional de ADN específica. La familia de moléculas de unión al ADN incluye activadores transcripcionales o proteínas represoras así como otras proteínas que se unen a ADN de hebra doble y/o sencilla. También incluye proteínas de unión a ADN específicas del suero que se pueden utilizar como marcadores para enfermedades malignas.

ES 2 306 900 T3

En una realización de la invención, se aplica el método proporcionado para detectar la interacción entre una proteína de unión a ARN y una molécula de ARN. Las proteínas de unión a ARN son necesarias para la regulación de la traducción de la expresión génica. Están implicadas en múltiples procedimientos post-traduccionales tales como la regulación del empalme pre-ARNm, la estabilidad del ARNm y el transporte de los ARN entre núcleo y citoplasma.
5 Por ejemplo, se puede utilizar una sonda que se une a una proteína de unión a ARN, como un anticuerpo contra un cierto factor de empalme, combinada con una segunda sonda que reconoce una secuencia de ARN específica.

Una señal FRET se produce solamente cuando tiene lugar una interacción entre el factor de empalme y el ARN. El método proporcionado permite la detección de una interacción proteína-ácido nucleico a nivel de la célula individual.
10 Para evitar la interferencia con una interacción entre las moléculas de interés, se prefiere que los dominios de unión de las sondas reconozcan y se unan a una región de las moléculas de interés que sea distinta del sitio de interacción entre dichas moléculas.

En otra realización, se proporcionan sondas que pueden detectar la interacción entre una proteína, tal como una proteína de unión a un carbohidrato (CBP), y un carbohidrato. Se ha reconocido ahora que las interacciones proteína-carbohidrato son mediadores importantes de la comunicación celular. En la última década se han descrito muchas CBP novedosas, y se ha documentado que algunas juegan papeles críticos en el tráfico de células y en la señalización celular. Las CBP reconocen ligandos carbohidratados de las glicoproteínas y glicolípidos. Se incluyen cuatro grandes familias de CBP, las siglec, las lectinas de tipo C, la galectinas y el subgrupo de receptores de antígenos de las células T (TCR) que reconocen ligandos carbohidratados presentados por moléculas presentadoras de antígenos CD1 y MHC.
15 20

En otro aspecto, la presente invención tiene que ver con un grupo de sondas que se pueden utilizar para la detección de una interacción proteína-lípido, siendo al menos una sonda reactiva con una proteína de interés y siendo al menos una sonda reactiva con un lípido de interés. La proteína puede ser una enzima, tal como una lipasa, una quinasa lipídica o una fosfatasa lipídica, que interacciona con un sustrato lipídico. La sonda proteica puede comprender un anticuerpo específicamente reactivo con dicha proteína. Una sonda lipídica de acuerdo con la invención puede ser un radical proteico con propiedades de unión a lípidos. Son particularmente interesantes aquellas sondas lipídicas que reconocen específicamente y se unen a una molécula lipídica que está implicada en rutas de transducción de señales, como los fosfoinositido polifosfatos y los segundos mensajeros lipídicos diacilglicerol (DAG) o ácido fosfatídico (PA). Se han utilizado proteínas con un dominio de homología con pleckstrina (PH)-proteína fluorescente verde quiméricas como sensor molecular para visualizar fosfoinositido polifosfatos (PtdInsP(n)) en células vivas. Una sonda lipídica adecuada incluye un dominio PH producido recombinantemente y purificado. También están incluidos el dominio de unión a DAG de la proteína quinasa C (PKC) y la región de unión a PA de la quinasa Raf. Una sonda lipídica comprende un anticuerpo dirigido contra un lípido específico, como un anticuerpo monoclonal específicamente reactivo con PtdIns (3).¹⁰ Pero también se pueden considerar otras sondas lipídicas.
25 30 35

Se puede utilizar un grupo de sondas conjugadas con colorantes de acuerdo con la invención para detectar una amplia variedad de eventos de transducción de señales diferentes, estables o transitorios, a nivel de células individuales. Estos incluyen la interacción de un receptor con una o más moléculas diferentes, la interacción de tipo receptor-ligando, la agrupación o multimerización de receptores, la interacción de un receptor con una molécula de señalización intracelular. Otros eventos que se van a detectar utilizando el método proporcionado en la presente memoria comprenden la interacción de diversas moléculas de señalización entre sí, como el acoplamiento de una proteína que contiene homología con Src 2 (SH2) con un resto fosfotirosina específico de otra proteína, o la unión de una proteína que contiene homología con Src 3 (SH3) a un tramo rico en prolina de otra proteína. Utilizando sondas específicas el presente método permite detectar interacciones entre proteínas citoesqueléticas así como entre proteínas nucleares (en el denominado signalosoma). La activación de una ruta de transducción de la señal incluye a menudo la fosforilación de proteínas por tirosina quinasa y/o serina/treonina quinasa. Las fosforilaciones de proteínas pueden cambiar las actividades de las enzimas y las conformaciones de las proteínas. El resultado eventual es una alteración de la actividad celular y cambios en el programa de genes expresados en las células respondedoras.
40 45 50

En otra realización, una sonda comprende un anticuerpo fosfoespecífico que reconoce específicamente una proteína en su estado fosforilado. Un resto fosforilado puede ser un resto tirosina, serina o treonina. Se pueden obtener anticuerpos fosfoespecíficos contra una amplia variedad de proteínas de señalización de numerosas compañías tales como Upstate Biotechnology, New England Biolabs, Sigma y muchas otras. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo específico de fosfotirosina marcado con Cy3 contra el receptor tirosina quinasa Erb para detectar específicamente la forma activada de este receptor. Otros ejemplos de sondas adecuadas incluyen un anticuerpo fosfoespecífico que reconoce solamente la forma fosforilada del factor de transcripción nuclear cabeza de tenedor en rhabdomyosarcoma (FKHR), proteína quinasa B (PKB), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Durante algunos años, se han utilizado análogos de nucleótidos que sirven como sustratos o inhibidores de enzimas, y derivados que se unen selectivamente a sitios reguladores de las proteínas de unión a nucleótidos como sondas estructurales y mecánicas para proteínas aisladas. Estos tipos de moléculas también representan sondas interesantes para poner en práctica un método de acuerdo con la invención.
55 60

Un método proporcionado en la presente memoria permite la detección de moléculas interaccionantes a nivel de células individuales. Las células individuales pueden ser analizadas utilizando p. ej. la citometría de flujo o la microscopía de fluorescencia. En una realización preferida, dicha detección se realiza mediante citometría de flujo. Una ventaja principal de la citometría de flujo es que proporciona directamente datos cuantitativos y que es muy rápida (los resultados de pueden obtener en unas pocas horas). La detección de la transferencia de energía mediante citometría
65

de flujo permite un análisis de alto rendimiento de las moléculas interaccionantes. La detección mediante citometría de flujo de alto rendimiento de las interacciones moleculares a nivel de células individuales permite estudios de las respuestas con el paso del tiempo y a la dosis de una o más de las interacciones anteriormente mencionadas, tales como eventos de transducción de señales, interacciones de factores de transcripción. Por ejemplo, la interacción entre el factor de transcripción Tcf-1 con beta-catenina, o la asociación de la proteína tirosina quinasa citosólica ZAP-70 con la cadena zeta CD3 del receptor de las células T (TCR), se pueden estudiar ahora a nivel de células individuales utilizando un grupo de sondas adecuadas de acuerdo con la invención. En una realización, el método proporcionado permite la detección de la interacción molecular a nivel de células individuales en células permeabilizadas y/o fijadas. Además, debido a que el método proporcionado puede detectar moléculas endógenas, es especialmente útil para investigar interacciones moleculares en células primarias. Por ejemplo se puede utilizar para discriminar entre células normales y anormales basándose en una o más de las interacciones anteriormente mencionadas. De este modo, la presente invención se pone en práctica preferiblemente con un par donador/aceptor que es adecuado para la detección de FRET mediante citometría de flujo. Un par comúnmente utilizado para FRET incluye isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC). Sin embargo, la sensibilidad es escasa debido al coeficiente de extinción molar relativamente bajo y al bajo rendimiento cuántico para FITC y TRITC. Además, las fuentes de láser para este par normalmente no se encuentran en los citómetros de flujo normalizados. Estos problemas no se encuentran cuando se utiliza el par R-ficoeritrina (R-PE)/Alofocianina (APC). Estos colorantes son complejos proteicos grandes que contienen múltiples cadenas y cromóforos que están unidos covalentemente. Pertenecen al grupo de ficobiliproteínas. La ficobiliproteínas son producidas naturalmente y están asociadas con los ficobilisomas y son utilizadas por diferentes cianobacterias o algas. El par PE/APC es muy prometedor debido a que se puede lograr el 90% de la eficacia FRET a pesar de los tamaños de PE y APC. Además, este par FRET puede ser detectado fácilmente en citómetros de flujo asequibles comercialmente tales como FACSCalibur, LSR, y FACS Vantage equipado con dos láseres comunes (o un diodo) en una configuración que emite a 488 y 632 nm.

La detección de la transferencia de energía utilizando la citometría de flujo o la separación de células activada por fluorescencia (FACS) ofrece la posibilidad de realizar un análisis multiparamétrico, rápido de células individuales específicas en una población heterogénea. La detección de marcadores fluorescentes múltiples en una célula mediante citometría de flujo proporciona una herramienta potente para el análisis de células individuales y permite la selección de subgrupos de una población de células diana. El análisis selectivo en una población de células diana aumenta la sensibilidad del método de detección.

Para la detección de las interacciones moleculares en células primarias, es especialmente ventajoso utilizar un marcador adicional para definir una población de células diana de interés. Un número importante de aplicaciones biológicas en enfermedades infecciosas, detección y control de enfermedades residuales mínimas, y terapia génica requieren típicamente el análisis y aislamiento de células raras (p. ej. células pluripotenciales/progenitoras hematopoyéticas) a partir de un gran fondo. Un método de acuerdo con la invención puede incluir tinción intracelular o tinción de un marcador de superficie para definir una población de células diana en una mezcla de células que comprende teñir con un anticuerpo marcador fluorescente capaz de identificar selectivamente dicho marcador celular. El presente método permite ahora seleccionar subgrupos de células que están presentes en una mezcla de células por medio de las características inmunofenotípicas, esto es, permite la detección de moléculas interaccionantes en una población rara de células.

En una realización preferida, se proporciona un método para identificar y/o aislar células individuales raras utilizando técnicas de citometría de flujo/separación de células de múltiples parámetros y para caracterizar la interacción molecular a nivel de las células individuales. El método proporcionado ahora permite la detección de moléculas interaccionantes en una mezcla de células anormales con células normales para identificar y cuantificar las células anormales basándose en una interacción aberrante entre las moléculas. Semejante método es particularmente adecuado para su aplicación a numerosos problemas importantes en el desarrollo del sistema inmunitario, enfermedades infecciosas, cáncer y terapia génica. Típicamente, antes de teñir una muestra de células con un grupo de sondas, se marcan las células con al menos un anticuerpo conjugado con un colorante relevante de acuerdo con los procedimientos normalizados con el fin de definir una población de células diana en una mezcla de células. Una mezcla de células comprende células vivas. También comprende células permeabilizadas y/o fijadas. Se proporciona un método que comprende teñir una muestra al menos en cuanto a un marcador celular para definir una población de células diana que comprende poner en contacto dicha muestra con un compuesto capaz de unirse selectivamente a un marcador celular. En una realización preferida, semejante compuesto está etiquetado directamente con un colorante fluorescente. Un compuesto adecuado comprende un anticuerpo marcado fluorescentemente o un fragmento de unión funcionalmente equivalente a este. Asimismo, se pueden utilizar un compuesto capaz de unirse selectivamente a un marcador celular que puede ser detectado utilizando un reactivo conjugado secundariamente con un colorante (p. ej. anticuerpo secundario marcado fluorescentemente). Un marcador celular comprende cualquier clase de marcador intracelular o unido a la membrana que se pueda utilizar para distinguir una subpoblación de células de una mezcla de células. Un marcador celular puede ser una agrupación de antígenos de diferenciación (CD). Los marcadores 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 del centro germinal, células dendríticas foliculares, células del plasma 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 CD humanos se pueden obtener de diversos proveedores, tales como BD Biosciences o Ancell Immunology Research Products, Bayport, USA. A menudo, son asequibles anticuerpos que están conjugados directamente con un fluorocromo de elección p. ej. CD10-PE o CD19-FITC, que es obviamente la elección preferida para poner en práctica el método de acuerdo con la invención.

La elección del colorante debe apuntar preferiblemente pero no exclusivamente al uso de dos o tres colorantes para el inmunofenotipaje además de los colorantes FRET para la detección de una interacción próxima de al menos dos moléculas. Por ejemplo, se puede combinar un grupo de sondas FRET de acuerdo con la invención con uno o más colorantes para mediar la selección de un subgrupo de leucocitos por medio de las características inmunofenotípicas, p. ej. CD10, CD19 y CD20 para definir exactamente los subgrupos de células B precursoras en la médula ósea, o CD1, CD4 y CD8 para definir los subgrupos de timocitos, o CD34 y/o CD117 para identificar las poblaciones de células pluripotenciales/precursoras.

En una realización, la invención proporciona un método de detección de al menos dos moléculas intercelulares interaccionantes utilizando un grupo de sondas de acuerdo con la invención, siendo cada una de las sondas reactiva con una molécula diferente que comprende proporcionar una muestra que comprende una célula, por medio de lo cual dicha muestra estará sujeta a fijación y permeabilización, poner en contacto dicha preparación con un grupo de sondas, cada sonda capaz de unirse a una molécula específica en condiciones que permiten la yuxtaposición de dichas sondas sobre dichas moléculas, eliminar cualquier sonda no unida y cualquiera unida no específicamente y detectar la yuxtaposición de dichas sondas por medio de FRET. La muestra se trata preferiblemente de tal manera que se obtenga la conservación de la morfología del material y la permeabilización con el fin de asegurar suficiente accesibilidad de la molécula de interés a la sonda. El tipo de tratamiento dependerá de numerosos factores, por ejemplo del fijador utilizado, del grado de fijación y del tipo y propiedades de las moléculas de interés. La fijación se puede llevar a cabo con un fijador tal como formaldehído. En una realización preferida, el método se pone en práctica para detectar las moléculas intercelulares que están situadas a una distancia muy próxima entre sí, por ejemplo a 100 Ångstroms, preferiblemente a 50 Ångstroms, más preferiblemente a 20 Ångstroms.

Se proporciona un método en el que se obtiene una muestra que comprende una célula primaria a partir de una muestra biológica. La muestra biológica puede ser una muestra de fluido corporal incluyendo sangre, médula ósea, orina, fluido cerebroespinal (CSF), saliva. También puede ser una muestra de tejido o producto homogenizado de tejido. Una muestra comprende una célula cultivada que puede ser una célula primaria cultivada, por ejemplo un fibroblasto dérmico cultivado obtenido de una biopsia de piel. Además, una muestra puede comprender una célula cultivada de una línea celular de laboratorio establecida, como HeLa, COS, MCF-7 o una línea celular Jurkat, que puede ser obtenida de numerosas fuentes tales como la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC; véase www.atcc.org para un catálogo en línea).

La invención proporciona un método para preparar un grupo de sondas, que comprende poner en contacto cada sonda con un colorante adecuado o un derivado del mismo para formar un producto conjugado entre dicha sonda y dicho colorante y purificar dicho producto conjugado del colorante en exceso que comprende adicionalmente poner en contacto al menos una sonda con un grupo reactivo adecuado o un derivado del mismo para formar un producto conjugado entre dicha sonda y dicho grupo reactivo y purificar dicho producto conjugado del exceso de grupo reactivo. Como se ha comentado antes, una sonda puede comprender un anticuerpo convencional (poli- o monoclonal) o sintético u otra molécula de unión, una sonda de unión a ácido nucleico, una sonda de ácido peptidonucleico capaz de hibridar con una secuencia de ácido nucleico específica, una molécula de unión a lípidos, una molécula de unión a carbohidratos. La presente invención se lleva a cabo ventajosamente utilizando sondas con efectos estéricos negativos mínimos sobre la eficacia de la transferencia de energía entre colorantes anclados a las sondas. Por ejemplo, se puede utilizar ventajosamente una sonda de anticuerpo más pequeña que una IgG completa, tal como Fab', Fab, un fragmento Fv de cadena sencilla o un fragmento bivalente de anticuerpo (dímero de scFv). Además, se puede utilizar un par FRET fluorescente de bajo peso molecular. Quizás el grupo funcional más conveniente y ampliamente utilizado para el marcaje de moléculas biológicas es el grupo amino primario. Este puede ser proporcionado por el grupo epsilon amino de un resto lisina, o el extremo N libre de un péptido/proteína. Alternativamente, es posible introducir una amina primaria que contiene grupos modificadores durante la síntesis automatizada, por ejemplo, de oligonucleótidos. Los ésteres activos estables de las especies de marcaje con flúor que se pueden almacenar como materiales sólidos, en particular ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) han sido utilizados extensamente a lo largo de muchos años para la acilación de tales grupos amino. Como alternativa al marcaje de grupos amino primarios, se pueden elegir como diana grupos que contienen tiol tales como aquellos contenidos en los restos cisteína o, como con los grupos amino primarios, aquellos introducidos como modificadores durante la síntesis automatizada (por ejemplo de oligonucleótidos) por los reactivos de marcaje de maleimida (por ejemplo Cy3 y Cy5). No siempre es factible considerar el uso de marcaje de amino primario o tiol en las moléculas biológicas. Una ruta común adicional para el marcaje, por ejemplo, de especies carbohidratadas es por medio de un grupo aldehído elegido como diana por reactivos de marcaje de hidrazida.

Se puede utilizar adecuadamente un kit comercial para obtener un grupo de sondas que comprende al menos dos sondas, cada sonda provista de un colorante y provista adicionalmente de un grupo reactivo. Típicamente, el marcaje y la purificación de productos conjugados de sondas con tales kits de marcaje se pueden completar fácilmente en tres horas, con muy poco tiempo de experiencia. Por ejemplo, existe un kit disponible para marcar una sonda proteínica, p. ej. un anticuerpo o un péptido, con un colorante fluorescente (www.probes.com/handbook/tables/1570.html). La cantidad de colorante necesaria para la muestra proteínica deseada se calcula utilizando las pautas esbozadas en el protocolo del kit. Generalmente, un colorante reactivo tiene un radical éster de succinimidilo que reacciona eficazmente con las aminas primarias de una sustancia proteínica para formar un producto conjugado con colorante estable. La purificación de un producto conjugado se puede completar fácilmente utilizando una columna de centrifugación o una columna de centrifugación de exclusión por tamaños. La razón de acoplamiento final se puede determinar de acuerdo con procedimientos normalizados conocidos por los expertos en la técnica. Una razón de colorante a proteína de aproximadamente 2,5 a 1 a menudo da como resultado la retención de la capacidad de la sonda para reconocer

específicamente una molécula y una fluorescencia suficiente para el uso de la técnica FRET. Del mismo modo, se encuentran disponibles diversos kits comerciales que se pueden utilizar para el marcaje de una sonda con un grupo reactivo, tal como biotina. El éster de biotina-XX sulfosuccinimidilo (SSE) es soluble en agua y reacciona con una amina primaria para formar un producto conjugado con biotina estable. La biotina-XX SSE tiene un espaciador de 14 átomos que potencia la unión de los derivados de biotina a sitios de unión relativamente profundos de la avidina. Un kit de marcaje contiene típicamente una columna de centrifugación lista para su uso para la purificación de una sonda biotinilada de los reactivos en exceso. La invención también proporciona un kit de ensayo de diagnóstico para la determinación de las moléculas interaccionantes en una muestra biológica que comprende un grupo de sondas de acuerdo con la invención. En una realización preferida, el kit de ensayo proporcionado que comprende un grupo de sondas para la detección mediada por FRET de moléculas interaccionantes se combina con uno o más anticuerpos conjugados con colorantes que se pueden utilizar para definir una población de células diana en una mezcla de células. Esto resulta ventajoso generalmente cuando la muestra comprende una muestra biológica. Por ejemplo, permite la identificación y cuantificación de células anormales en una mezcla de células anormales con células normales, p. ej. basándose en complejos de señalización anormales definidos. Se pueden detectar muchos complejos de señalización anormales diferentes en aplicaciones de diagnóstico utilizando un método de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se puede evaluar la interacción de las proteínas RAG1 y RAG2 en leucemias linfoides que tienen transposiciones en marcha. Solamente en aquellas células en las que los dímeros de RAG1 y RAG2 están trabados a la secuencia de ADN diana, están en progreso las transposiciones. Otro ejemplo implica la detección de una interacción de beta-catenina desfosforilada con un miembro de la familia de los factores de transcripción TCF. Solamente en aquellas células en las que se detecta una señal después de la activación celular, los factores TCF son transcripcionalmente activos. De este modo, un método proporcionado en la presente memoria proporciona medios para controlar, opcionalmente a nivel de células individuales, la señalización Wnt normal y patológica, p. ej. en carcinoma de colon, melanomas, cáncer de próstata, cáncer de mama etc.

Además, se utiliza ventajosamente un método o un grupo de sondas de la invención en el área del descubrimiento de fármacos, p. ej. para seleccionar un compuesto fármaco (candidato) entre una biblioteca de compuestos. Después de la identificación del fármaco diana, las compañías biofarmacéuticas necesitan un sistema rápido para escrutar la diana frente a las bibliotecas de compuestos para identificar aquellos compuestos que tendrán un efecto sobre la diana y que demostrarán el potencial para convertirse en fármacos eficaces. En una realización, se utiliza un método basado en FRET de la invención para escrutar los compuestos que afectan a la interacción entre dos o más moléculas de la célula, p. ej. compuestos que pueden estimular o inhibir la formación de complejos de señalización tales como los signalosomas. Hasta ahora, se ha utilizado un grupo de sondas que comprende una primera sonda que es reactiva con una primera proteína del complejo de señalización y una segunda sonda que es reactiva con una segunda proteína del complejo. Cuando el complejo está intacto, la primera y segunda proteínas interaccionan de manera que las sondas conjugadas con colorante se yuxtaponen y se puede detectar la señal FRET. Tras la adición de un compuesto (p. ej. una molécula candidata a fármaco) que se une a un componente del complejo, se interrumpe la interacción entre las proteínas dentro del complejo. Como resultado, las sondas unidas a proteínas ya no están yuxtapuestas y no se produce FRET. Por supuesto, se puede acometer un enfoque similar para escrutar compuestos que estimulan o potencian la interacción entre moléculas. En ese caso, no se detecta señal FRET en ausencia del compuesto pero la adición del compuesto sitúa dos o más moléculas en íntima proximidad entre sí de manera que se produce FRET. En otra realización, se utiliza un método como el proporcionado en la presente memoria para detectar la interacción entre un compuesto (fármaco) y su diana, esto es, las moléculas interaccionantes son el compuesto y la diana. Esto requiere un grupo de sondas en el que una sonda es reactiva con el compuesto y otra sonda es reactiva con la diana (proteína), por ejemplo, se pueden utilizar una sonda de anticuerpo específico del compuesto y una sonda de anticuerpo específico de la diana. Se puede imaginar que el desarrollo de anticuerpos específicos para cientos de compuestos diferentes que se van a escrutar no es muy atractivo p. ej. en un entorno de escrutinio de elevado rendimiento. Sin embargo, se pueden proporcionar diferentes compuestos con una etiqueta idéntica (epítipo) de manera que se pueda utilizar solamente una sonda (anticuerpo) dirigida contra la etiqueta junto con una sonda específica de la diana para detectar la interacción entre el compuesto y su diana.

Leyendas

Figura 1. Diagrama esquemático del principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) con un fluorocromo X como colorante donador e Y como colorante aceptor.

A. El colorante aceptor Y no será excitado por la luz de emisión del colorante donador X, si la distancia entre X e Y es demasiado grande. B. Si la distancia entre el colorante donador y el aceptor es suficientemente pequeña (<80 Ångstroms pero preferiblemente <50 Ångstroms), la luz de emisión del colorante donador X excitará al colorante aceptor Y.

Figura 2. Dibujo esquemático de las proteínas A y B que interaccionan íntimamente reconocidas por un anticuerpo anti-A y anti-B.

A. Se conjuga la sonda A con el colorante donador X y la sonda B con el colorante aceptor Y. Además, ambas sondas se conjugan con biotina. B. Tras la incubación con las sondas A y B, las sondas se pueden unir por medio de incubación con avidina, siempre que las sondas reconozcan y se unan en efecto con las proteínas A y B íntimamente interaccionantes. Esta yuxtaposición de las dos sondas de anticuerpo (estabilizadas por el sistema biotina-avidina) es detectable por medio del principio FRET (véase la Figura 1).

Descripción detallada

La invención proporciona un método para la detección de proteínas y otras moléculas interaccionantes utilizando un grupo de al menos una primera y una segunda sondas, cada sonda provista de un colorante donde dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía, estando provistas dichas sondas de al menos un grupo reactivo donde dicho grupo reactivo permite modular la yuxtaposición de dichas sondas de manera que haya un aumento de la probabilidad de transferir energía entre ellas. Preferiblemente, aunque no exclusivamente, un grupo de sondas de acuerdo con la invención comprende un grupo de dos anticuerpos conjugados con colorante, cada anticuerpo provisto adicionalmente de un grupo reactivo. Para ilustrar la invención, se describirá la preparación de semejante grupo de sondas.

Ejemplo

Preparación del grupo de sondas

Los métodos para producir un anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica, p. ej. utilizando la tecnología del hibridoma o la presentación en fagos. 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 controla tomando muestras de sangre de ensayo y determinando el título de la reactividad. Cuando se obtienen títulos apropiadamente elevados, se recoge la sangre del animal y se prepara el antisuero. Si se desea se puede realizar el fraccionamiento adicional del antisuero para enriquecerlo en anticuerpos reactivos contra la proteína. Véase p. ej. Harlow et al. *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante diversos mecanismos familiares para los expertos en la técnica. Los anticuerpos obtenidos pueden ser caracterizados mediante técnicas de inmunodiagnóstico convencionales p. ej. mediante transferencia Western utilizando productos lisados de células que expresan una proteína de fusión recombinante o mediante ELISA.

Marcaje con biotina de los anticuerpos

La biotina es conjugada con las proteínas típicamente por medio de aminas primarias (esto es, lisinas). Normalmente, se conjugan entre 3 y 6 moléculas de biotina con cada anticuerpo. Se somete a diálisis o se intercambia sobre una columna el anticuerpo en carbonato 100 mM, pH 8,4. Se mide la concentración de anticuerpo después del equilibrio con tampón. (Para IgG, 1 mg/ml tiene una A(280) de 1,4). Si la concentración de anticuerpo es menor de 1 mg/ml, la conjugación será probablemente sub-óptima. Si es necesario, diluir el anticuerpo a una concentración de 4 mg/ml. Disolver 10 mg de Biotina (N-hidroxisuccinimidobiotina, Pierce) en 1 ml de DMSO anhidro (dimetilsulfóxido anhidro, Aldrich) inmediatamente antes de su uso. La molécula de biotina reactiva es inestable. Una vez que se ha solubilizado la biotina, se debe utilizar inmediatamente. Añadir biotina para dar una razón de 80 μ g por mg de anticuerpo; mezclar inmediatamente. Envolver el tubo en aluminio; incubar y hacer girar a la temperatura ambiente durante 2 horas. Eliminar la biotina que no ha reaccionado y cambiar el anticuerpo a Tris 10 mM pH 8,2, NaCl 150 mM, pHix (5 mg/ml pentaclorofenol en etanol del 95% (utilizar en forma de 10.000x, o 3-4 gotas por litro) Sigma).

Conjugación con fluorocromo de una sonda

Como se ha comentado antes, se puede utilizar una gran variedad de colorantes o fluorocromos para marcar una sonda de acuerdo con la presente invención. Como ejemplo, se proporciona la conjugación con Cy5 de una sonda de anticuerpo pero por supuesto se pueden elegir muchos otros fluorocromos. La conjugación completa se puede realizar típicamente en aproximadamente medio día. La molécula Cy reactiva es inestable. Abrir un vial, y pesar la cantidad que se necesite (típicamente, 1 o 2 mg es más que suficiente). Volver a sellar el vial y almacenar con secante a 4 grados Celsius. Disolver inmediatamente el Cy5 en DMSO a una concentración de 10 mg/ml.

I. Preparación de anticuerpo

Someter a diálisis o intercambio sobre una columna el anticuerpo en carbonato 500 mM, pH 9,5. Medir la concentración de anticuerpo después del equilibrio con tampón. (Para IgG, 1 mg/ml tiene una A(280) de 1,4). Si la concentración de anticuerpo es menor de 1 mg/ml, la conjugación será probablemente sub-óptima. Si es necesario, diluir el anticuerpo a una concentración de 4 mg/ml.

II. Conjugación covalente

Se acopla Cy5 covalentemente con aminas primarias (lisinas) de la inmunoglobulina. Disolver el Cy5 (Cy5-bis-OSU, N,N'-biscarboxipentil-5,5'-disulfonato-indodi-carbocianina, Amersham Life Science) en DMSO anhidro (dimetilsulfóxido, Aldrich) inmediatamente antes de su uso, a una concentración de 10 mg/ml. No demorarse entre el pesaje de Cy5 y disolverlo en DMSO; del mismo modo, no demorar la adición de la sustancia solubilizada al anticuerpo. Para una proporción óptima de 5:1, añadir 40 μ g de Cy5 por mg de anticuerpo; mezclar inmediatamente. Envolver el tubo en aluminio; incubar y hacer girar a la temperatura ambiente durante 1 hora. Eliminar el Cy5 que no ha reaccionado y cambiar el anticuerpo a Tris 10 mM pH 8,2, NaCl 150 mM, pHix (Sigma; 5 mg/ml de pentaclorofenol en etanol del 95% (utilizar en forma de 10.000x, o 3-4 gotas por litro), mediante filtración en gel o diálisis.

Referencias

- 5 1. **Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, et al**, Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Pathol* 1990; 136: 1215-22.
2. **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.
- 10 3. **Chan FK, Siegel RM, Zacharias D, et al**, Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signalling using spectral variants of the green fluorescent protein. *Cytometry* 2001; 44: 361-8.
4. **Siegel RM, Chan FK, Zacharias DA, et al**, Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. *Sci STKE* 2000; 2000: L1.
- 15 5. **Wouters FS, Bastiaens PI**. Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr Biol* 1999; 9:1127
6. **Guo C, Dower SK, Holowka D, Baird B**. Fluorescence resonance energy transfer reveals interleukin (IL)-1-dependent aggregation of IL-1 type I receptors that correlates with receptor activation. *J Biol Chem* 1995; 270:27562
- 20 7. **Broudy VC, Lin NL, Buhring HJ, et al**, Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood* 1998; 91: 898-906.
- 25 8. **Szollosi J, Damjanovich S, Matyus L**, Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: Routine and research. *Cytometry* 1998; 34:159
9. **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.
- 30 10. **Chen R, Kang VH, Chen J, et al**, A monoclonal antibody to visualize PtdIns(3,4,5)P(3) in cells. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50(5):697

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un grupo de al menos una primera y una segunda sondas moleculares, cada sonda provista de un colorante donde dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía, comprendiendo cada sonda un dominio de unión capaz de unirse específicamente a una molécula de interés, y donde dichas sondas están provistas adicionalmente de un grupo reactivo capaz de unirse específicamente a una sustancia formadora de puentes que permite la yuxtaposición de dichas al menos primera y segunda sondas después de la unión a dicha molécula de interés y donde dicho grupo reactivo no está implicado en la unión a la molécula de interés.
- 10 2. Un grupo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho grupo reactivo permite yuxtaponer dichos colorantes a una distancia de 10 nanómetros (100 Ångstroms) entre sí, preferiblemente a una distancia de 5 nanómetros (50 Ångstroms) entre sí, más preferiblemente a una distancia de 2 nanómetros (20 Ångstroms) entre sí.
- 15 3. Un grupo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde un grupo reactivo de dicha primera sonda no es directamente reactivo con dicha segunda sonda.
- 20 4. Un grupo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos una sonda está provista de una multiplicidad de dichos grupos reactivos.
- 5 5. Un grupo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha sonda es un anticuerpo o un fragmento de unión funcionalmente equivalente a este.
- 25 6. Un grupo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde al menos una sonda es un ácido nucleico.
7. Un grupo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde al menos uno de dichos colorantes es un fluorocromo.
- 30 8. Un grupo de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho fluorocromo se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), Rojo Texas (TR), R-ficoeritrina (R-PE), alofococianina (APC), miembros de las ficobiliproteínas, Cy3, Cy5, Cy5,5, Cy7, colorantes de cianina, colorantes de Flúor Alexa, productos conjugados en tándem de los mismos, y colorantes de puntos cuánticos.
- 35 9. Un grupo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho grupo reactivo es la biotina.
- 40 10. Un método *in vitro* para detectar al menos dos moléculas interaccionantes en una célula utilizando un grupo de al menos una primera y una segunda sondas moleculares, cada sonda provista de un colorante donde dichos colorantes juntos permiten la transferencia de energía y comprendiendo cada sonda un dominio de unión capaz de unirse específicamente a una molécula de interés diferente, donde dichas sondas están provistas adicionalmente de un grupo reactivo que no está implicado en la unión a la molécula de interés y capaz de unirse específicamente a una sustancia formadora de puentes, permitiendo la yuxtaposición de dichas al menos primera y segunda sondas después de la unión a dicha molécula de interés de manera que haya un aumento de la probabilidad de transferencia de energía entre dichos colorantes, donde un grupo reactivo de dicha primera sonda no es reactivo directamente con dicha segunda sonda, que comprende:
- 45 proporcionar un grupo de sondas
proporcionar una muestra que comprende una célula
- 50 -poner en contacto dicha muestra con dicho grupo de sondas
-en condiciones que permiten yuxtaponer dichas sondas sobre dichas moléculas interaccionantes
- 55 - poner en contacto dichas sondas con una sustancia capaz de conectar al menos un grupo reactivo de dicha primera sonda con dicha segunda sonda, y
-detectar la yuxtaposición de dichas sondas por medio de FRET para detectar dichas moléculas interaccionantes.
- 60 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha sustancia permite yuxtaponer dichos colorantes a una distancia de 0,2-10 nanómetros (2 a 100 Ångstroms) entre sí.
- 65 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, donde dicho grupo reactivo comprende biotina y donde dicha sustancia comprende avidina o estreptavidina.
13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que incluye la tinción de dicha muestra para al menos un marcador celular para definir una población de células diana que comprende poner en

ES 2 306 900 T3

contacto dicha muestra con un compuesto capaz de unirse selectivamente a dicho marcador celular, donde dicho marcador celular es preferiblemente una agrupación de antígenos de diferenciación (CD).

5 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde al menos una de dichas moléculas es una sustancia proteínica, un ácido nucleico, una molécula lipídica o un carbohidrato.

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 que permite la detección a nivel de células individuales, utilizando preferiblemente citometría de flujo.

10 16. Un kit de diagnóstico que comprende un grupo de sondas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

17. Un kit de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende adicionalmente la sustancia formadora de puentes.

15 18. El uso de un grupo de sondas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 para escrutar un compuesto que afecta a la interacción entre dos o más moléculas en una célula.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

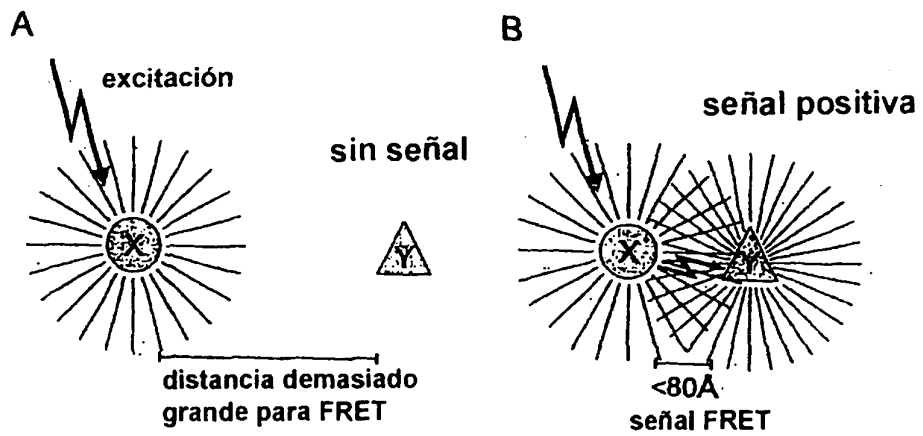


Figura 1

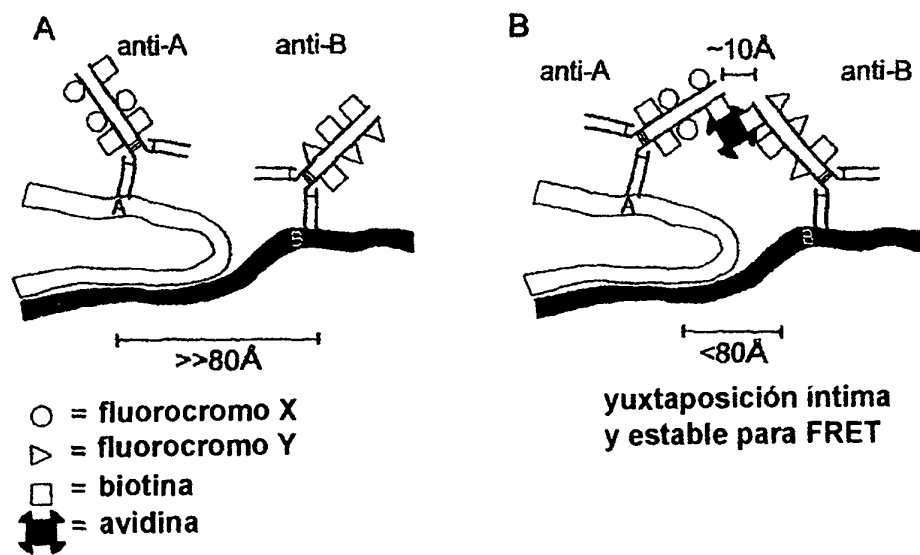


Figura 2