(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 423 598**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
C07H 21/02	(2006.01)
C07H 21/04	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2002** **E 10179993 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013** **EP 2264165**

(54) Título: **Selección y aislamiento de células vivas usando sondas que se unen a ARNm**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2013

(73) Titular/es:

CHROMOCELL CORPORATION (100.0%)
685 U.S. Highway One
North Brunswick, NJ 08902, US

(72) Inventor/es:

SHEKDAR, KAMBIZ y
BLOBEL, GUNTER

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 423 598 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

Selección y aislamiento de células vivas usando sondas que se unen a ARNm

Antecedentes de la invención

Una baliza molecular es una sonda de ácido nucleico que reconoce e informa de la presencia de una secuencia de ácido nucleico específica. Las sondas son secuencias con forma de horquilla con una cadena central de nucleótidos complementaria a la secuencia diana y extremos que comprenden secuencias cortas mutuamente complementarias. Un extremo está unido covalentemente a un fluoróforo y el otro a una resto apantallador. Cuando está en su estado nativo con los extremos hibridados, la proximidad del fluoróforo y el apantallador es tal que no se produce fluorescencia. La baliza experimenta un cambio conformacional fluorogénico espontáneo cuando hibrida con su ácido nucleico diana. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. 5.925.517.

Esta propiedad ha permitido a los investigadores detectar ácidos nucleicos específicos principalmente en reacciones *in vitro* y, en algunos casos, incluso en células vivas. La visualización *in situ* de ARN mensajero se ha conseguido usando balizas moleculares administradas a células vivas en liposomas (Matsuo, 1998, Biochim. Biophys. Acta 1379: 178-184).

Además, se ha discutido la detección en tiempo real de la hibridación ADN/ARN en células vivas usando balizas moleculares (Sokol et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 11538-11543 (1998)).

Los estudios que implican células han empleado, hasta la fecha, balizas generadas con el fluoróforo muy débil EDANS ya que éste era el único conocido que se apantallaba por el apantallador EDAC. Los resultados aunque discernibles apenas lo son y la aplicabilidad de esta línea de investigación para la detección in vivo no fue prometedora.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona particularmente un método para generar líneas celulares que expresan un primer ARN de interés, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar células vivas que se sospecha que expresan dicho primer ARN de interés;

(b) exponer dichas células vivas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho primer ARN de interés;

(c) detectar las células que presentan fluorescencia de dicha primera baliza molecular;

(d) aislar dichas células detectadas que fluorescen; y

(e) generar líneas celulares a partir de las células aisladas, así como un

método para aislar células vivas que expresan al menos dos ARN de interés, que comprende las etapas de:

(a) introducir en células vivas ADN que codifica un primer ARN de interés y ADN que codifica un segundo ARN de interés;

(b) exponer dichas células vivas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho primer ARN de interés;

(c) exponer dichas células vivas a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho segundo ARN de interés;

(d) detectar las células que presentan fluorescencia de ambas dicha primera baliza molecular y dicha segunda baliza molecular; y

(e) aislar dichas células detectadas que fluorescen.

Además, también se describe un método para generar una línea celular que expresa al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con al menos una construcción de ADN que codifica al menos una proteína preseleccionada y al menos un marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer las células seleccionadas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de la al menos una proteína preseleccionada;

d) aislar las células que fluorescen;

e) generar una línea celular que expresa la al menos una proteína preseleccionada creciendo las células aisladas.

El método mencionado anteriormente puede llevarse a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia. En un aspecto adicional, la línea celular puede prepararse para expresar una segunda proteína preseleccionada llevando a cabo etapas adicionales incluyendo transfectar la línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica una segunda proteína preseleccionada y un segundo marcador de resistencia a fármacos; seleccionar las células que expresan el segundo marcador; exponer las células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de la segunda proteína preseleccionada y aislar las células que presentan fluorescencia de cada uno de los al menos uno y el segundo transcritos de ARNm. Las líneas celulares que expresan más de dos proteínas pueden proporcionarse repitiendo las etapas. El método para introducir la segunda proteína puede realizarse bien simultáneamente o secuencialmente. Si el primer y segundo marcadores de resistencia a fármacos son los mismos, la selección simultánea puede conseguirse incrementando el nivel del fármaco.

En la presente memoria también se describe un método para generar una línea celular que expresa al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con al menos una construcción de ADN que codifica la al menos una proteína preseleccionada, al menos un marcador de resistencia a fármacos y al menos una primera etiqueta de epítopo;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer las células a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el transcrito de ARN de la primera etiqueta de epítopo;

d) aislar las células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa la al menos una proteína preseleccionada creciendo las células aisladas.

El método mencionado anteriormente puede llevarse a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia. La parte de ADN de la construcción que codifica la etiqueta de epítopo puede estar en marco o fuera de marco con la parte de la construcción de ADN que codifica la al menos una proteína. En una realización adicional, la línea celular puede prepararse para expresar al menos una segunda proteína preseleccionada; incluyendo además las etapas transfectar la línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica la segunda proteína preseleccionada, un segundo marcador de resistencia a fármacos y una segunda etiqueta de epítopo, seleccionar las células que transcriben el segundo marcador; exponer las células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el transcrito de ARN de la segunda etiqueta de epítopo y aislar las células que presentan fluorescencia de cada una de la primera y la segunda etiqueta de epítopo. En el caso de dos proteínas, la parte de la secuencia de ADN que codifica la segunda etiqueta de epítopo también puede estar en marco o fuera de marco con la parte de la secuencia de ADN que codifica la segunda proteína. La segunda proteína preseleccionada puede transfectarse bien simultáneamente o secuencialmente con la primera. Si el método se realiza simultáneamente, y se usa el mismo marcador de resistencia a fármacos para ambas construcciones, puede usarse un nivel más alto de fármaco para seleccionar las células que expresan ambas construcciones. Además, pueden proporcionarse más de dos proteínas en la línea celular repitiendo las etapas mencionadas anteriormente.

En la presente memoria se describe además un método para generar una línea celular que expresa una molécula de ARN antisentido preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con una construcción de ADN que codifica la al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada y al menos un gen de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer las células a una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con la molécula de ARN antisentido;

d) aislar las células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa la secuencia de ARN antisentido preseleccionada creciendo las células aisladas.

El aislamiento de las células que fluorescen puede llevarse a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia. La línea celular puede prepararse para expresar al menos una segunda molécula de ARN antisentido preseleccionada, incluyendo las etapas además transfectar simultáneamente o secuencialmente la línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica una segunda molécula de ARN antisentido preseleccionada y un segundo marcador de resistencia a fármacos; seleccionar las células que expresan el segundo

marcador; exponer las células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con la segunda molécula de ARN antisentido; y aislar las células que presentan fluorescencia de cada uno del al menos uno y el segundo transcritos de ARNm. Si el método se realiza simultáneamente y se usa el mismo marcador de resistencia a fármacos en ambas construcciones, la selección puede conseguirse usando un nivel más alto de fármaco. Pueden proporcionarse más de dos moléculas de ARN antisentido repitiendo las etapas mencionadas anteriormente con otra construcción.

En la presente memoria se describe además un método para generar una línea celular que expresa al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con una construcción de ADN que codifica la al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada, al menos un marcador de resistencia a fármacos y secuencia de nucleótidos de una primera etiqueta de epítopo;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer las células seleccionadas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARNm de la primera etiqueta de epítopo;

d) aislar las células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa la al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada creciendo las células aisladas.

La línea celular puede prepararse para expresar al menos un segundo ARN antisentido etiquetado con epítopo preseleccionado, incluyendo además las etapas transfectar la línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica un segunda molécula de ARN antisentido etiquetada con epítopo preseleccionada y un segundo marcador de resistencia a fármacos; seleccionar las células que expresan el segundo marcador; exponer las células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de la segunda etiqueta de epítopo; y aislar las células que presentan fluorescencia de ambos el al menos uno y el segundo transcritos de ARNm. Estas etapas pueden llevarse a cabo simultáneamente o secuencialmente con la primera. La selección usando transfección simultánea con ambas construcciones que tienen el mismo marcador de resistencia a fármacos puede conseguirse usando un nivel más alto de fármaco, Pueden llevarse a cabo etapas adicionales para introducir más de dos moléculas antisentido etiquetadas con epítopo.

Los métodos anteriores pueden usarse para preparar células que expresan moléculas de ARN antisentido o cualquier otro tipo de molécula de ARN, incluyendo pero no limitado a ARN estructurales, incluyendo ARNr, así como ARNhn y ARNsn. Además, debe indicarse que en todos los métodos en los que se proporciona una etiqueta de epítopo para la detección por una baliza molecular de la construcción transfectada, no es importante si la etiqueta de epítopo está en marco o fuera de marco con la proteína codificada, siempre que la secuencia de la etiqueta de epítopo sea detectable por la baliza molecular.

También se describe un método ara aislar células que expresan al menos una proteína o ARN que comprende las etapas de:

a) proporcionar células que se sospecha que expresan la al menos una proteína;

b) exponer las células a al menos una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARNm que codifica la al menos una proteína;

c) aislar las células que fluoescen.

La tecnología de separación de células activada por fluorescencia puede usarse para aislar las células que fluorescen. La proteína puede ser, como ejemplo no limitativo, una proteína localizada en la superficie celular o una proteína intracelular. También puede detectarse cualquier otro ARN. El método también puede usarse para identificar células que también expresan una segunda proteína o ARN, usando una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con su ARN diana que se expone a las células, aislándose las células que tienen fluorescencia de cada una de la primera y segunda balizas moleculares. También puede conseguirse la expresión simultánea de más de dos proteínas.

También se describe un método para cuantificar el nivel de la expresión de al menos un transcrito de ARN en una muestra biológica que comprende las etapas de:

a) exponer la muestra biológica a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el transcrito de ARN;

b) cuantificar el nivel de fluorescencia en la muestra biológica; y

c) correlacionar el nivel de fluorescencia con el nivel del al menos un transcrito de ARN.

La muestra biológica puede ser una muestra celular o una muestra de tejido. La muestra puede estar fijada. El transcrito de ARN puede ser, pero no está limitado a, ARN que codifica una proteína, un ARN estructural o un ARN antisentido. La fluorescencia puede cuantificarse por microscopía de fluorescencia o tecnología se separación de células activada por fluorescencia. El nivel de la expresión del al menos un segundo transcrito de ARN también puede cuantificarse en la muestra biológica usando una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el segundo transcrito de ARN.

En la presente memoria se describe además un método para generar una línea celular que sobreexpresa al menos una proteína que comprende las etapas de:

a) transfectar células con al menos dos secuencias de ADN, una secuencia que tiene una parte que codifica la proteína, al menos una etiqueta de epítopo y al menos un marcador de resistencia a fármacos; y una segunda secuencia que tiene una parte que codifica la proteína, al menos una segunda etiqueta de epítopo y al menos un segundo marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células transfectadas con las al menos dos secuencias de ADN por expresión del primer y el segundo marcadores de resistencia a fármacos;

c) exponer las células seleccionadas a una primera y una segunda baliza molecular, cada una que fluoresce después de hibridar con las secuencias de nucleótidos de los transcritos de ARN de la primera y la segunda etiquetas de epítopo respectivamente;

d) aislar las células que presentan fluorescencia de cada una de la primera y segunda balizas moleculares; y

e) generar una línea celular que sobreexpresa la al menos una proteína preseleccionada creciendo las células aisladas.

En la descripción anterior las al menos dos secuencias de ADN pueden residir en la misma construcción. La primera y la segunda etiquetas de epítopo pueden estar cada una independientemente en marco o fuera de marco con la proteína. Puede usarse FACS para aislar las células que expresan ambas construcciones aislando las células que expresan la fluorescencia más intensa. Igual que con los métodos previos descritos en la presente memoria, la transfección puede hacerse simultáneamente o secuencialmente. La selección cuando está presente el mismo marcador de resistencia a fármacos en ambas construcciones y se realiza una transfección simultánea puede conseguirse incrementando el nivel del fármaco.

En un aspecto adicional, se describe un método para generar una línea celular que sobreexpresa al menos una molécula de ARN antisentido que comprende las etapas de:

a) transfectar células con al menos dos secuencias de ADN, una secuencia que tiene una parte que codifica la proteína, al menos una etiqueta de epítopo y al menos un marcador de resistencia a fármacos; y una segunda secuencia que tiene una parte que codifica la proteína, al menos una segunda etiqueta de epítopo y al menos un segundo marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células transfectadas con las al menos dos secuencias de ADN por expresión del primer y el segundo marcadores de resistencia a fármacos;

c) exponer las células seleccionadas a una primera y una segunda baliza molecular, cada una que fluoresce después de hibridar con las secuencias de nucleótidos de los transcritos de ARN de la primera y la segunda etiquetas de epítopo respectivamente;

d) aislar las células que presentan fluorescencia de cada una de la primera y segunda balizas moleculares; y

e) generar una línea celular que sobreexpresa la al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada creciendo las células aisladas.

Las al menos dos secuencias de ADN pueden residir en la misma construcción. La primera y la segunda etiquetas de epítopo pueden estar cada una independientemente en marco o fuera de marco con la molécula de ARN antisentido. Las condiciones y métodos alternativos para conseguir el producto deseado son como se han indicado anteriormente. Además, puede proporcionarse cualquier forma de ARN.

En la presente memoria también se describe un método para generar células funcionalmente nulas para la expresión de al menos una proteína o ARN preseleccionado que comprende las etapas de proporcionar a las células una pluralidad de ARN antisentidos de la proteína o ARN preseleccionado, en el que la pluralidad de ARN antisentido de la al menos una proteína o ARN preseleccionado se une esencialmente a todos los transcritos de ARN del ARNm u otro ARN que se quiere eliminar. En el caso de preparar las células nulas para una proteína preseleccionada, la proteína preseleccionada puede ser específicamente sólo una o un subconjunto de formas con corte y empalme alternativo de un producto génico.

En la presente memoria también se describe un método para generar un animal transgénico no humano que es un mutante con expresión funcionalmente nula de al menos una proteína preseleccionada que comprende llevar a cabo las etapas como se ha descrito anteriormente en la presente memoria utilizando células madre embrionarias, determinar la viabilidad de las células madre con expresión funcionalmente nula de la proteína seleccionada y usar las células madre embrionarias viables para producir el animal transgénico.

Además, en la presente memoria se describe un método para generar una línea celular con expresión funcionalmente nula para al menos una proteína y que sobreexpresa al menos una proteína diferente que comprende llevar a cabo los métodos se describe en la presente memoria en las mismas células. Además, se describe un método para generar una línea celular que expresa un ARN antisentido letal bajo el control de un promotor inducible llevando a cabo los métodos anteriores en los que la etapa (a) se realiza en presencia de una cantidad mínima de un inductor.

Un método para identificar los eventos genéticos de recombinación en células vivas que comprende las etapas de:

a) exponer una célula a una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con una secuencia de ARN seleccionada del grupo que consiste en la transcrita a partir de una secuencia recombinada y la transcrita a partir de la secuencia no recombinada;

b) detectar o separar dichas células.

La detección y/o separación de las células puede realizarse por FACS o microscopio.

En la presente memoria también se describe una sonda de hibridación unitaria que genera actividad proteolítica, referida en la presente memoria como una proteasa sonda. Dichas proteasas sonda operan de una manera similar a una baliza molecular, pero en lugar de un cambio en la fluorescencia cuando la baliza interacciona con su secuencia de ácido nucleico diana, la proteasa sonda se vuelve proteolítica en presencia de la diana. La composición de proteasa sonda proporciona en un extremo de un oligonucleótido de tipo baliza molecular una proteasa y en el otro, un inhibidor de proteasa complementario. Cuando el oligonucleótido no hibrida con una secuencia diana, la proximidad de los extremos del oligonucleótido permite que la proteasa y el inhibidor de la proteasa interaccionen, inhibiendo la actividad proteolítica de la proteasa. Sin embargo, después de hibridar la secuencia diana del oligonucleótido con la diana, la proteasa y su inhibidor se separan, activando la proteasa. La actividad de la proteasa puede medirse fácilmente y, además, la proteasa activa en presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular puede emplearse no sólo para propósitos de detección sino también para propósitos terapéuticos, en los que, por ejemplo, una célula a la que se administra la proteasa sonda se proteoliza y se vuelve no viable si se transcribe un gen particular, por ejemplo, uno relacionado con la transformación celular, oncogénesis, desproliferación y semejantes.

La sonda mencionada anteriormente puede tener un inhibidor de la enzima proteolítica que es un péptido u otra molécula capaz de inactivar reversiblemente la enzima. Los ejemplos no imitativos de enzimas e inhibidores incluyen aminopeptidasa y amastatina, proteasas de cisteína semejantes a tripsina y antipaína, aminopeptidasa y bestatina, proteasas de cisteína semejantes a quimiotripsina y quimiostatina, aminopeptidasa y diprotina A o B, carboxipeptidasa A y EDTA, proteasas de serina semejantes a elastasa y elastinal y termolisina o aminopeptidasa M y 1,10-fenantrolina.

Éstos y otros aspectos de la invención se apreciarán a partir de la descripción detallada siguiente.

Descripción detallada de la invención

La invención de la presente memoria se basa en la capacidad de sondas moleculares de identificar secuencias de ARN en células vivas, y el uso de tecnología de separación de células por fluorescencia o relacionada para identificar y/o separar células que presentan un determinado nivel de fluorescencia a una o más longitudes de onda. Ahora se sabe que EDAC puede apantallar las emisiones de una variedad de los fluoróforos más intensos usados comúnmente. Su capacidad para detectar de manera fiable y eficaz los ARNm así como otros ARN en las células vivas permite su uso para identificar y, si se desea, separar células tomando como base sus características deseadas, por ejemplo usando un Separador de Células Activado por Fluorescencia (FACS). La aplicación proporciona numerosos métodos que simplifican y reducen en gran medida el tiempo necesario para llevar a cabo los procedimientos conocidos previamente y también ofrece nuevas estrategias. Los estudios llevados a cabo hasta ahora que implican balizas moleculares y células vivas no muestran una diferencia significativa sobre el control. El problema se elimina usando en primer lugar fluoróforos más intensos y también modificando las balizas de manera que el número de nucleótidos que forman la parte del tallo de la molécula en horquilla es mayor que la longitud clásica que se usa de cinco o seis nucleótidos. Esto hace que sea más posible que la molécula se mantenga en su estado de horquilla, no fluorescente en ausencia de secuencia diana, reduciendo de esta manera el ruido de fondo.

Es posible con la metodología descrita anteriormente en la presente memoria generar líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan ARN con diferentes papeles; esto es, algunos que nunca codifican proteínas ni actúan como ARN antisentido pero que no obstante son expresados por las células, otros que funcionan como ARN

mensajeros y otros que son ARN antisentido de las dos clases ya listadas. Dichos otros ARN incluyen ARN estructurales tales como ARN ribosómicos, ARNhn, ARNsn, etc.

1. Generación de líneas celulares que expresan proteínas

Algunas de las etapas más pesadas implicadas en la generación de líneas celulares se eliminan por la aplicación de balizas moleculares como se describe en la presente memoria. Después de la selección por fármacos de células transfectadas con una construcción de ADN que codifica un gen deseado así como resistencia a fármacos, se introducen en estas células balizas moleculares diseñadas para reconocer el mensaje del gen de interés. Aquellas células que transcriben el gen fluorescerán. El análisis FACS posterior resulta en el aislamiento de las células fluorescentes que se crecen entonces para dar lugar a líneas celulares que expresan el gen elegido.

Si la baliza diseñada para reconocer un mensaje de interés es capaz de detectar secuencias que existen endógenamente, la proporción de éstas en comparación con la proporción de la secuencia diana producida por las células transfectadas es tal que el separador es capaz de discriminar los dos tipos celulares. Alternativamente, el problema de la fluorescencia endógena se elimina etiquetando el gen de interés con una etiqueta de epítopo y diseñando la baliza de manera que reconozca la secuencia de nucleótidos que codifica la etiqueta. Estos nucleótidos pueden estar bien en marco con el mensaje del gen o fuera de marco con éste, dependiendo de si se desea etiquetar la proteína producida.

Además, el nivel de expresión del gen de interés en cualquier célula dada puede variar. El FACS se aplica aquí para evaluar los niveles de expresión; se usa para seleccionar diferencialmente las células individuales que expresan el mismo gen.

2. Generación de líneas celulares que expresan antisentido

Existen varios estudios que describen la generación de líneas celulares que expresan no ARN que codifica una proteína, sino uno que es el antisentido de un gen o parte de un gen. Dichos métodos pretenden reducir la cantidad de una proteína específica en una célula dada. Las etapas descritas anteriormente para la generación de líneas celulares que expresan proteínas son igualmente aplicables aquí y virtualmente idénticas excepto en que aquí la baliza se diseña para detectar un ADN que es un ARN antisentido.

No todos los intentos de preparar líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan antisentido resultan en líneas celulares en las que la expresión de la proteína diana se afecte lo suficiente. Esta dificultad ha hecho que merezca menos la pena continuar con la producción de dichas líneas celulares. Sin embargo, dada la facilidad del procedimiento descrito aquí, se ensaya fácilmente la eficacia de numerosas secuencias genéticas diferentes para su capacidad de rendir líneas celulares activas que expresan antisentido.

3. Diferenciación entre células basado en antígenos localizados en la superficie celular

Los inmunólogos y otros han usado durante mucho tiempo el FACS para separar células. Según la presente invención, para detectar la presencia de proteínas localizadas en la superficie celular, se prepara una baliza que tiene como su diana el ARNm que codifica la proteína de interés. La baliza se introduce en células por transfección y el separador de células se usa entonces para aislar las células con calificación positiva.

Además, FACS se usa actualmente para separar células tomando como base su expresión de hasta tres proteínas localizadas en la superficie celular. Esta característica de FACS se lleva a cabo por el uso de balizas moleculares como se describe en la presente memoria si se usa una combinación de balizas, cada una dirigida al ARNm de una de las proteínas de interés y cada una marcada de manera diferente. Se realizan múltiples ciclos de separación para separar las células tomando como base más de tres ARN expresados.

4. Ensayo de células para la expresión de ARN específicos y cuantificación del nivel de la expresión de ARN en células

Si el ARN diana de una baliza molecular que se introduce en una célula está presente, la célula fluorescerá. Esta información puede evaluarse cualitativamente por el uso del Microscopio de Fluorescencia o FACS y también es cuantificable por cualquiera de éstos. Por ejemplo, en lugar de realizar la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) *in situ* en cortes de tejidos para determinar un patrón de expresión para un ARN particular, se usa una baliza para llevar a cabo el mismo experimento. Además, usando una combinación de balizas fluorescentes diferentes, cada una dirigida a un ARN específico, se ensaya la presencia o cantidad de varios ARN de interés en una etapa.

5. Localización de antígenos en combinación con la detección de ARN en células y tejidos

Usando células fijadas o cortes de tejidos, se usa inmunocitoquímica para describir la localización de los antígenos proteicos reconocidos y usando Balizas Moleculares dirigidas a ARN específicos, se co-localizan en las mismas muestras los ARN de interés. Se ha mostrado que las Balizas Moleculares dirigidas a ARN funcionan en células fijadas.

6. Generación de líneas celulares que expresan múltiples proteínas

Usando los métodos de la presente invención, se generan muy rápidamente líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan cualquier número de proteínas, incluso sin la necesidad de mantener estas células en presencia de una mezcla de numerosos fármacos selectivos. Después de la transfección génica y la selección por fármaco, se introduce en las células una combinación de balizas moleculares, una para cada mensaje de proteína. Mediante el diseño de la secuencia bucle de cada baliza para hibridar con el ARNm sólo de uno de los genes o con la secuencia de nucleótidos de sólo una de las etiquetas de epítopo (véase anteriormente) con la que los mensajes pueden estar asociados, cada baliza se diseña para reconocer el ARNm codificado por sólo uno de los genes. Las células se separan entonces por FACS. Mediante la selección de una, dos o las tres señales fluorescentes, se genera una variedad de líneas celulares en una única aplicación.

Se puede tener una necesidad de producir una línea celular que expresa más de tres ARN de interés. Por ejemplo, sería altamente informativo tener una línea celular en la que están sobreexpresadas todas las proteínas y secuencias de ARN que se piensa están implicadas en la formación de un complejo particular. Para conseguir esto, se repiten las etapas descritas anteriormente usando células que ya expresan una combinación de ARN como las células huésped en las que se transfectarían construcciones adicionales que codifican ARN adicionales.

Si múltiples ARN que se van a expresar se clonan todos en construcciones que confieren a las células resistencia al mismo fármaco, se usa FACS para aislar las células que expresan todos los ARN deseados. Como las secuencias están integradas de manera estable en el genoma, las células no pierden la expresión de ninguna de las secuencias. Sin embargo, es posible que se pierda una o más de las secuencias. Si éste es el caso, se incrementa la concentración del fármaco selectivo en el medio en el que crecen estas células, haciendo que esta posibilidad sea menos probable. Alternativamente, se usan construcciones cada una de las cuales confiere resistencia a un fármaco diferente y se mantienen las células en una mezcla de fármacos apropiada. También, se elige un subconjunto de las construcciones que se van a transfectar de manera estable en las células de manera que codifique un gen de resistencia para un fármaco y otro subconjunto para que codifique un gen de resistencia para otro fármaco.

Además, si algunas células de una línea celular pierden un ADN de interés, entonces como un recurso, se realiza el primer experimento como se ha descrito anteriormente para aislar la línea celular se repite y se obtienen nuevas células. Alternativamente, la mezcla de células descrita se analiza por FACS, con el objetivo de re-aislar las células que expresan todos los ARN deseados. Éste es un procedimiento muy útil ya que rinde de nuevo células que dan lugar a una línea celular con la misma base genética que la línea celular original seleccionada.

Las estrategias descritas anteriormente rinden un suministro ilimitado de células que expresan cualquier combinación de proteínas y secuencias de ARN, susceptibles de métodos de análisis virtualmente ilimitados. Es posible además que una proteína que está sobreexpresada pueda ser tóxica para la célula y, como se discutirá más adelante, esta posibilidad puede abordarse fácilmente.

Debe indicarse que la facilidad con la que es posible re-aislar las células que expresan todos los ARN deseados a partir de clones de líneas celulares en las que la población de células incluye algunas células que ya no expresan todos los ARN hace posible mantener líneas celulares en ausencia de fármaco o con concentraciones mínimas de fármaco.

7. Generación de líneas celulares que sobre-expresan dramáticamente una o más proteínas

Para cada gen que quiere sobre-expresarse mucho, por ejemplo, se clonan en primer lugar dos o más secuencias para el mismo gen en construcciones de ADN que confieren resistencia a fármacos. Cada una de las múltiples secuencias para cada gen se diseña para incluir la secuencia que codifica una etiqueta de epítopo diferente. Después de la transfección de las construcciones de ADN en células y la selección con fármaco posterior, se introducen en las células balizas moleculares, cada una de las cuales está dirigida sólo a una etiqueta de epítopo y marcadas con fluorescencia de forma diferente, y se usa el separador celular para aislar las células positivas para sus señales. Dichas células han integrado en sus genomas al menos una copia de cada uno de los genes etiquetados con secuencia de epítopo de forma diferente y así la expresión de la secuencia de interés ocurre a partir de un número incrementado de copias de esencialmente la misma secuencia de interés. Este método se usa conjuntamente con el uso de FACS para escoger aquellas células que presenten más intensamente la señal de cada fluoróforo.

8. Generación de líneas celulares que expresan múltiples ARN antisentido

Se crean líneas celulares transfectadas de manera estable que producen múltiples mensajes antisentido como sigue. Dichos mensajes antisentido están dirigidos a ARNm u otros ARN. Se seleccionan células que expresan a diferentes niveles una cualquiera de las secuencias antisentido transfectadas. A través de ciclos repetidos de transfecciones estables, se seleccionan fácilmente las células que darán lugar a líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan el mensaje antisentido de un número ilimitado de ARN.

Por supuesto, las células que expresan otros ARN distintos de los ARN antisentido se pueden preparar por los métodos descritos en la presente memoria. Dichos ARN incluyen pero no están limitados a ARNm, ARNr, otros ARN estructurales, ARNhn o ARsn.

9. Generación de líneas celulares que son inactivaciones génicas funcionales para una o más proteínas

Los métodos como se describen en la presente memoria proporcionan los medios para preparar inactivaciones génicas funcionales en células cultivadas. Esto elimina la necesidad de intentar descifrar el papel de proteínas humanas estudiando sus características de inactivación génica en levaduras o ratones. Se generan líneas celulares que son inactivaciones génicas funcionales de una proteína cualquiera de interés generando células que expresan a partir de múltiples loci virtualmente el mismo ARN antisentido frente a una única secuencia de ARN. Por ejemplo, se transfectan de manera estable en células múltiples construcciones cada una de las cuales codificará el ARN antisentido para un gen particular. Aquí, cada secuencia de ARN antisentido sólo se diferencia en que cada una estará etiquetada con la secuencia de nucleótidos de una única etiqueta de epítopo. Se seleccionan aquellas células que expresan todos los ARN antisentido etiquetados diferencialmente. Como se usa FACS para cuantificar la fluorescencia como se ha descrito previamente, esta característica permite seleccionar aquellas células que expresan de manera más intensa una cualquiera o más de las secuencias antisentido.

De forma importante, en esta estrategia se usan diferentes secuencias antisentido dirigidas al mismo gen. Por ejemplo, algunos de los ARN antisentido, cuya expresión se selecciona usando balizas moleculares y FACS, se diseñan de manera que estén dirigidos a una región particular del ARN mensajero para el gen, mientras que otros se diseñan de manera que estén dirigidos a una parte alternativa del mismo mensajero. Con el fin de generar líneas celulares que son inactivaciones génicas funcionales de una proteína de interés, se transfectan de manera estable en células tantas secuencias genéticas que codifican ARN antisentido similares o diferentes frente al mismo gen de interés como sea necesario para la producción de una línea celular que no presenta niveles detectables de expresión de la proteína de interés, o alternativamente, niveles aceptablemente bajos de expresión.

Además, se generan líneas celulares en las que múltiples proteínas presentan inactivación génica funcional repitiendo el procedimiento descrito anteriormente mientras se toma como diana cualquier número de secuencias que se van a inactivar genéticamente funcionalmente por antisentido. Por ejemplo, para estudiar la función de un complejo de proteínas, se pueden inactivar genéticamente todas o cualquier combinación de las proteínas que forman el complejo.

10. Generación de líneas celulares que son inactivaciones génicas funcionales sólo de formas seleccionadas con corte y empalme alternativo de uno o más genes

Las versiones con diferente corte y empalme de un único gen se traducen frecuentemente en proteínas con diferentes funciones. Usando los métodos como se describe en la presente memoria, se generan líneas celulares que son inactivaciones génicas funcionales sólo de formas con corte y empalme alternativo de una o más proteínas. Por ejemplo, diseñando antisentido que se dirigirán sólo a aquellas versiones con corte y empalme alternativo del ARN mensajero del gen que se quiere eliminar de la célula, se inactivan genéticamente funcionalmente todos los ARN con corte y empalme alternativo del gen de interés excepto aquellos mensajes con corte y empalme alternativo que son de interés.

11. Generación de líneas celulares que expresan una o más proteínas mientras presentan inactivación génica funcional de una o más proteínas diferentes

Es posible, con la metodología descrita anteriormente en la presente memoria, generar líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan ARN con diferentes papeles; esto es, algunos que nunca codifican proteínas ni actúan como ARN antisentido pero que, no obstante, son expresados por las células, otros que funcionan como ARN mensajeros y otros que son ARN antisentido de las dos clases ya listadas. Éstos incluyen pero no están limitados a ARN estructurales tales como ARN ribosómico, ARNhn, ARNsn y otros distintos de ARNm.

Por ejemplo, Para un grupo dado de proteínas que se piensa que interaccionan entre sí, se pueden estudiar sus interacciones generando líneas celulares transfectadas de manera estable en las que una o más de las proteínas de interés se inactivan genéticamente funcionalmente por la expresión celular de ARN antisentido. Puede estudiarse la función de las proteínas restantes de interés en la célula pero quizá de forma más interesante, dicha célula podría alterarse adicionalmente manipulándola adicionalmente de manera que ahora sobre-exprese una o más de las proteínas restantes de interés. Dicha línea de pensamiento puede impulsarse infinitamente más, permitiendo sobre-expresar o eliminar la expresión de proteínas adicionales en las células.

Los métodos descritos anteriormente transforman la ciencia de las células de mamíferos y otras células susceptibles de mantenimiento en cultivo tisular para permitir muchas manipulaciones genéticas imposibles hasta ahora. Por primera vez, es posible generar inactivaciones génicas funcionales en células humanas distintas de las células derivadas de célula madre embrionarias humanas obtenidas exclusivamente por un método que necesita la destrucción de un embrión y también que tengan estas proteínas sobre-expresadas. De nuevo, es posible que la sobreexpresión de determinadas proteínas o una inactivación génica funcional de determinadas proteínas pueda ser letal para las células. Esto es un problema que se abordará más adelante.

12. Generación de ratones transgénicos

Para algunos propósitos, el estudio de las células en cultivo no es suficiente. La metodología descrita anteriormente, sin embargo, también, se presta a la manipulación de células madre embrionarias distintas de las células derivadas a partir de células madre embrionarias humanas obtenidas exclusivamente por un método que necesita la destrucción de un embrión. Pueden obtenerse células madre embrionarias que podrían expresar múltiples proteínas o actuar como inactivaciones génicas funcionales de múltiples proteínas o un subconjunto de las formas con corte y empalme alternativo de múltiples proteínas, etc., siguiendo los procedimientos anteriores. Dichas células madre embrionarias se usan entonces como la base para la generación de animales no humanos con inactivación génica. Usando estos procedimientos, se determina antes de intentar la generación de un animal con inactivación génica si el experimento resultará en un fenotipo letal. Por ejemplo, si una proteína que es esencial se inactiva genéticamente funcionalmente en células madre embrionarias, entonces dichas células pueden no sobrevivir después de su aislamiento por FACS.

13. Generación de líneas celulares transfectadas de manera estable inducibles

La sobre-expresión o la ausencia de expresión de determinadas proteínas o ARN en las células puede ser letal. Aún así puede tener una importancia crítica estudiar una célula que sobre-expresa una proteína o ARN tóxico, o una que es una inactivación génica funcional de una proteína o ARN sin el cual la célula es incapaz de sobrevivir. Para este fin, se generan células transfectadas de manera estable en las que ARN seleccionados que tienen dichos efectos perjudiciales en la célula están bajo el control de promotores inducibles. Para aislar dichas líneas celulares, las células transfectadas y seleccionadas con fármaco se inducen en primer lugar mínimamente para afectar la transcripción de los genes inducibles y las células se someten entonces a análisis FACS después de la transfección en ellas de balizas moleculares diseñadas para reconocer los ARN apropiados. Las células obtenidas se mantienen de manera que los ARN tóxicos no están inducidos y se transcriben sólo cuando es necesario.

Los sistemas inducibles pueden ser ventajosos para aplicaciones distintas de la expresión de ARN tóxicos. Por ejemplo, se induce la expresión de secuencias genéticas transfectadas de manera estable en células en un determinado punto durante el ciclo celular de una línea celular sincronizada. Alternativamente, si se piensa que los productos expresados de un conjunto de una o más secuencias genéticas transfectadas de manera estable actúan en los productos expresados de otro conjunto, entonces es interesante clonar las secuencias genéticas del primer conjunto bajo el control de un promotor inducible, y aquellas del segundo conjunto bajo el control de un segundo promotor inducible. Mediante inducciones variadas, se estudian los productos expresados codificados por cualquiera de los conjuntos de secuencias genéticas bien en ausencia o presencia de los productos expresados del otro conjunto.

14. Detección de eventos genéticos de recombinación en células vivas y el aislamiento posterior de las células no recombinadas o recombinadas diferencialmente

Paralelamente al uso de balizas moleculares para detectar los eventos de recombinación que dan lugar a líneas celulares estables está el uso de balizas para detectar y aislar a partir de una mezcla de células vivas aquellas células que han experimentado otros eventos de recombinación específicos. El mismo principio puede usarse para ensayar para recombinación VDJ, translocación e integración de genoma viral, por ejemplo.

En los eventos de recombinación celulares, por ejemplo, una secuencia de ADN genómico se intercambia por otra. Si una secuencia de ADN que codifica una región en la que un evento de recombinación ocurrido se transcribe en ARN, entonces la presencia de dicho evento se detecta por una baliza molecular diseñada para reconocer bien el ARN transcrito a partir de la secuencia de ADN no recombinada o que se transcribe a partir de la secuencia recombinada. Dicho ensayo también se lleva a cabo por el Microscopio de Fluorescencia. Si se quieren separar unas de otras células que se han recombinado de aquellas que no lo han hecho, se somete a las células a FACS y se separan. Además, FACS se usa para separar células tomando como base la presencia o ausencia en ellas de numerosos eventos de recombinación.

15. Separación de células tomando como base ARN expresados

El uso de balizas moleculares como se describe en la presente memoria permite separar las células tomando como base su expresión de proteínas localizadas internamente así como proteínas frente a las cuales puede no ser posible generar anticuerpos. Por ejemplo, empezando a partir de una población mixta de células, se aíslan aquellas células que expresan proteínas localizadas internamente de interés diseñando balizas moleculares que reconocen los ARNm que dan lugar a estas proteínas. Estas balizas moleculares se transfectan en la mezcla de células y se usa FACS para separarlas según sea apropiado. Pueden llevarse a cabo múltiples ciclos de separación.

Además, un investigador puede estar interesado, por ejemplo, en aislar las células que se inducen después de la estimulación por una citoquina para expresar el ARNm de una o más proteínas específicas de aquellas que no se inducen de manera similar. Para este fin, una mezcla de células se induce en primer lugar por la citoquina, después se transfectan con balizas cada una de las cuales está diseñada para reconocer el ARNm que dará lugar a una de las proteínas de interés. Entonces se usa FACS para aislar aquellas células con calificación positiva para el ARNm

de interés. En una realización alternativa, también se ensayan células infectadas con un virus, por ejemplo, para su expresión de un gen particular.

Es posible, con la metodología descrita anteriormente en la presente memoria, detectar células positivas para la presencia de ARN con diferentes papeles; esto es, algunos que nunca codifican proteínas ni actúan como ARN antisentido pero que, no obstante, son expresados por las células, otros que funcionan como ARN mensajeros y otros que son ARN antisentido de las dos clases ya listadas. Éstos incluyen pero no están limitados a ARN estructurales tales como ARN ribosómico, ARNhn, ARNsn y otros distintos de ARNm.

16. Detección *in vivo* de ácidos nucleicos, en conexión con la selección posterior de las células

Como la química requerida está bien caracterizada, se pueden modificar balizas moleculares de muchas maneras, dando lugar a nuevas posibilidades. Por ejemplo, las células que expresan un ARNm específico cuya expresión da lugar a la transformación maligna de la célula se destruyen selectivamente mientras que las células que no expresan este ARNm permanecen más o menos inalteradas, como se describe más adelante. Se selecciona una baliza molecular que consiste en un oligonucleótido diseñado para reconocer e hibridar con una secuencia específica de ácido nucleico contenida en un gen de interés que se transcribe en parte de una mezcla de células. El oligonucleótido tiene unido covalentemente en un extremo una proteasa y en su otro extremo una o más moléculas del inhibidor de la proteasa, por ejemplo, un inhibidor peptídico. Obsérvese que es importante para el oligonucleótido usado sintetizar una baliza tal que tenga extremos que puedan hibridar entre sí, como es el caso de las balizas moleculares. Siempre que la molécula descrita mantenga su estructura de horquilla, el inhibidor peptídico en un extremo de la molécula estará lo suficientemente cerca de la proteasa que está en el otro extremo como para efectuar la inhibición. Para facilitar la discusión, dichas moléculas recién descritas se referirán como Proteasas Sonda.

Después de la transfección de las proteasas sonda en las células que expresan el ARN que es reconocido por una Proteasa Sonda, la Proteasa Sonda hibrida con su diana. Esto causa la activación de la proteasa ya que en su estado hibridado la proteasa no está ya en la proximidad de su inhibidor peptídico. Una célula en la que está presente y es reconocida la diana de dicha Proteasa Sonda resulta dañada y así se selecciona.

Además, las Proteasas Sonda son útiles en varias aplicaciones adicionales. Por ejemplo, dada una mezcla de células en la que algunas de las células están infectadas con un virus particular, se introduce en las células una Proteasa Sonda que está dirigida a un ARNm viral específico. Las células que portan dicho ARNm activan la actividad proteolítica de la Proteasa Sonda que contienen y esto destruye estas células.

Es posible con la metodología descrita anteriormente en la presente memoria generar líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan ARN con diferentes papeles; esto es, algunos que nunca codifican proteínas ni actúan como ARN antisentido pero que, no obstante, son expresados por las células, otros que funcionan como ARN mensajeros y otros que son ARN antisentido de las dos clases ya listadas.

Tomando como base la descripción anterior, pueden llevarse a cabo los métodos siguientes.

Se proporciona un método para generar una línea celular que expresa al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar líneas celulares con al menos una construcción de ADN que codifica dicha al menos una proteína preseleccionada y al menos un marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células seleccionadas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de dicha al menos una proteína preseleccionada;

d) aislar las células que fluorescen;

e) generar una línea celular que expresa dicha al menos una proteína preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

En este método, el aislamiento de dichas células que fluorescen puede llevarse a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia. La línea celular puede prepararse además para expresar una segunda proteína preseleccionada, bien de manera simultánea o secuencial, incluyendo las etapas adicionales transfectar la línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica una segunda proteína preseleccionada y un marcador de resistencia a fármacos; seleccionar las células que expresan dicho segundo marcador; exponer dichas células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de dicha segunda proteína preseleccionada y aislar las células que presentan fluorescencia de cada uno de dicho al menos uno y dicho segundo transcritos de ARNm. Actualmente, la tecnología actual permite la detección de hasta tres fluoróforos diferentes durante un procedimiento de separación, ahora, el procedimiento

anterior puede repetirse simultáneamente para obtener la expresión de hasta tres proteínas diferentes. Si se desea, una línea celular que expresa tres proteínas diferentes puede usarse entonces como punto de partida para la introducción de más proteínas siguiendo el procedimiento.

La construcción de ADN usada para la transfección puede codificar un único gen y un marcador de resistencia a fármacos, o genes adicionales con marcadores correspondientes. La transfección exitosa de cada gen puede conseguirse mediante la selección con el fármaco correspondiente. Como se ha indicado anteriormente, ya se haga la introducción de los genes adicionales simultáneamente o secuencialmente, el número de mensajes expresado detectable en un momento puede estar limitado por la tecnología de fluorescencia, pero el método puede llevarse a cabo repetidamente para añadir más genes. Si pueden detectarse hasta tres fluoróforos, pueden introducirse tres genes al mismo tiempo.

Se describe una estrategia relacionada en la que una etiqueta de epítopo asociada con el gen transfectado se usa como la diana para la baliza molecular, permitiendo la selección de células que expresan proteínas cuyos ARNm pueden ser difíciles de identificar sobre el fondo, por ejemplo, si la baliza molecular detecta un especie de ARN muy relacionada. De acuerdo con esto, se proporciona un método para generar una línea celular que expresa al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con al menos una construcción de ADN que codifica dicha al menos una proteína preseleccionada, al menos un marcador de resistencia a fármacos y al menos una primera etiqueta de epítopo;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el transcrito de ARN de dicha primera etiqueta de epítopo;

d) aislar dichas células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa dicha al menos una proteína preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

Los métodos son esencialmente los mismos que los descritos previamente, excepto que la baliza molecular que se usa se diseña para reconocer la etiqueta de epítopo en lugar del transcrito de ARN de la proteína introducida deseada. Un beneficio de este procedimiento sobre el previo es que sólo se necesita un pequeño número de balizas moleculares, correspondientes al número de diferentes etiquetas de epítopo, para preparar un gran número de diferentes líneas celulares que expresan una o más proteínas. Como la tecnología del separador de fluorescencia está ahora limitada a tres fluoróforos, sólo son necesarias tres balizas diferentes de este método. Si la tecnología permitiera más adelante detectar simultáneamente números incrementados de fluoróforos, esto puede incrementarse. Sin embargo, pueden añadirse hasta tres proteínas introducidas al mismo tiempo, entonces las células transfectadas con éxito con los tres genes pueden usarse como el punto de partida para la adición de más genes.

Los ejemplos de etiquetas de epítopo que pueden usarse en la invención, y frente a las que pueden prepararse balizas, incluyen pero no están limitadas a HA (proteína hemaglutinina de influenza), myc, his, proteína C, VSV-G, FLAG o FLU. Éstas y otras etiquetas de epítopo son conocidas para el experto en la técnica. Tal y como se usa en la presente memoria, la etiqueta de epítopo proporciona una secuencia de ácido nucleico única para el reconocimiento por una baliza molecular. Si la secuencia de ácido nucleico está en marco o no o fuera de marco con la proteína codificada en una construcción no es crítico; la baliza molecular puede reconocer ambas. Así, el ARN transcrito que porta la secuencia de ácido nucleico de la etiqueta de epítopo no necesita traducirse para la detección del transcrito por la baliza molecular.

Por supuesto, el método anterior puede usarse para introducir más de una proteína en las células, incluyendo las etapas adicionales realizadas simultáneamente o secuencialmente transfectar la línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica la segunda proteína preseleccionada, un segundo marcador de resistencia a fármacos y una segunda etiqueta de epítopo, seleccionar las células que expresan dicho segundo marcador; exponer dichas células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el transcrito de ARN de dicha segunda etiqueta de epítopo y aislar dichas células que presentan fluorescencia de cada una de dicha primera y dicha segunda etiqueta de epítopo. La segunda etiqueta de epítopo puede estar en marco o fuera de marco con la parte de la secuencia de ADN que codifica dicha segunda proteína.

La selección de células transfectadas con éxito se lleva a cabo por procedimientos estándar de crecimiento de las células en presencia del fármaco frente al que se proporciona el marcador de resistencia a fármacos. Si la selección es para dos marcadores diferentes, éstos pueden seleccionarse simultáneamente o secuencialmente. Si se usa el mismo marcador de resistencia a fármacos en dos construcciones transfectadas diferentes, puede necesitarse un mayor nivel de fármaco para seleccionar las células transfectadas con ambas construcciones, para tener en cuenta el efecto de la dosis.

Los métodos anteriores para preparar líneas celulares que expresan una o más proteínas pueden aplicarse fácilmente para generar líneas celulares que expresan una o más moléculas de ARN antisentido. El método comprende:

a) transfectar una línea celular con una construcción de ADN que codifica dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada y al menos un gen de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células a una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicha molécula de ARN antisentido;

d) aislar dichas células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa dicha secuencia de ARN antisentido preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

Todos los detalles de estos métodos son como se han descrito anteriormente. En el caso en el que una baliza no pueda detectar el ARNm particular, puede usarse el método de la etiqueta de epítopo, concretamente:

a) transfectar una línea celular con una construcción de ADN que codifica dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada, al menos un marcador de resistencia a fármacos y una primera secuencia de nucleótidos de etiqueta de epítopo;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células seleccionadas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARNm de dicha primera etiqueta de epítopo;

d) aislar dichas células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

Como se ha indicado anteriormente, la ventaja del método de detección de la etiqueta de epítopo es que no tienen que prepararse balizas separadas para cada ARN antisentido; las balizas se necesitan sólo para unas pocas etiquetas de epítopo, que pueden usarse en etapas sucesivas para introducir una gran número de moléculas antisentido, o la sobreexpresión de una molécula en una línea celular. Naturalmente, los métodos anteriores pueden repetirse simultáneamente o sucesivamente para introducir dos o más moléculas de ARN antisentido en una línea celular dada.

Además, las células preparadas para expresar una proteína o proteínas particulares pueden usarse como el punto de partida para crear células que expresan proteínas y moléculas de ARN antisentido. Por supuesto, las células que expresan las moléculas antisentido pueden usarse como el punto de partida para añadir proteínas expresadas, usando los métodos de la presente memoria. También puede realizarse la transfección simultánea de proteínas y moléculas antisentido, con balizas correspondientes y, si se desea, etiquetas de epítopo. Las varias combinaciones de los procedimientos mencionados anteriormente están englobadas en la presente memoria.

Asimismo, se describen métodos para aislar células que expresan al menos una proteína que comprenden las etapas de:

a) proporcionar células que se sospecha que expresan dicha al menos una proteína;

b) exponer dichas células a al menos una baliza molecular que fuoresce después de hibridar con un transcrito de ARNm que codifica dicha al menos una proteína;

c) aislar dichas células que fluorescen.

Estos métodos son particularmente útiles para proteínas que son proteína localizada en la superficie celular o una proteína intracelular. No requieren el uso de sondas para las proteínas en sí mismas, lo que puede ser más difícil o afectará a la célula de manera que no pueden realzarse experimentos adicionales. Puede identificarse más de una proteína usando una pluralidad de balizas moleculares, hasta el número detectable simultáneamente por la tecnología usada para el aislamiento.

Naturalmente, los procedimientos mencionados anteriormente pueden usarse para cuantificar el nivel de la expresión de al menos un transcrito de ARN en una muestra biológica que comprende las etapas de:

a) exponer la muestra biológica a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho transcrito de ARN;

b) cuantificar el nivel de fluorescencia en la muestra biológica; y

c) correlacionar el nivel de fluorescencia con dicho nivel del al menos un transcrito de ARNm.

La muestra biológica puede ser una muestra celular o una muestra de tejido; éstas pueden estar fijadas, por ejemplo, con formaldehido, glutaraldehído, o cualquier número de fijadores celulares conocidos que no interfieren con la detección de ARN usando balizas moleculares.

El transcrito de ARN detectado puede ser ARN que codifica una proteína, un ARN estructural y un ARN antisentido. La fluorescencia puede cuantificarse por microscopía de fluorescencia o tecnología de separación de células activada por fluorescencia. Pueden cuantificarse especies de ARN adicionales simultáneamente usando una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un segundo transcrito de ARN.

En otro uso de los métodos anteriores, se proporciona un método para generar una línea celular que sobreexpresa al menos una proteína. Esto se consigue transfectando células con dos o más secuencias que codifican la misma proteína, seleccionando e identificando la expresión a través de etiquetas de epítopo asociadas con las copias separadas del transcrito. Las etapas incluyen:

a) transfectar células con al menos dos secuencias de ADN, teniendo cada una de dichas secuencias una parte que codifica la proteína, al menos una etiqueta de epítopo y al menos un marcador de resistencia a fármacos; y una parte que codifica la misma proteína, al menos una segunda etiqueta de epítopo y al menos un segundo marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células transfectadas con las al menos dos secuencias de ADN por expresión del primer y el segundo marcadores de resistencia a fármacos;

c) exponer las células seleccionadas a una primera y una segunda baliza molecular, cada una de las cuales fluoresce después de hibridar con las secuencias de nucleótidos de los transcritos de ARN de dicha primera y segunda etiquetas de epítopo, respectivamente;

d) aislar las células que presentan fluorescencia de cada una de dicha primera y segunda balizas moleculares; y

e) generar una línea celular que sobreexpresa dicha al menos una proteína preseleccionada creciendo las células aisladas.

Como se ha indicado anteriormente, si se usa el mismo marcador de resistencia a fármacos para cada copia del gen, puede necesitarse un nivel mayor de fármaco para seleccionar las células transfectadas con ambas secuencias. Como en los métodos previos, las al menos dos secuencias de ADN pueden residir en la misma construcción. La primera y dicha segunda etiquetas de epítopo pueden estar cada una independientemente en marco o fuera de marco con la proteína.

El procedimiento mencionado anteriormente es fácilmente aplicable para generar células que sobreexpresan al menos una molécula de ARN antisentido. El método comprende las etapas de:

a) transfectar las células con al menos dos secuencias de ADN, teniendo cada una de las secuencias una parte que codifica dicha molécula de ARN antisentido, al menos una etiqueta de epítopo y al menos un marcador de resistencia a fármacos; y una parte que codifica dicha molécula de ARN antisentido, al menos una segunda etiqueta de epítopo y al menos un segundo marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células transfectadas con dichas al menos dos secuencias de ADN por expresión de dicho primer y dicho segundo marcadores de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células seleccionadas a una primera y una segunda baliza molecular, cada una de las cuales fluoresce después de hibridar con las secuencias de nucleótidos de los transcritos de ARN de dicha primera y dicha segunda etiquetas de epítopo, respectivamente;

d) aislar dichas células que presentan fluorescencia de cada una de dicha primera y segunda balizas moleculares; y

e) generar una línea celular que sobreexpresa dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

Los detalles son los mismos que los descritos anteriormente.

La introducción de moléculas de ARN antisentido en células es útil para eliminar funcionalmente una o más proteínas de la célula. Siguiendo los métodos anteriores, se describe un método para generar células funcionalmente nulas para la expresión de al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de

proporcionar en dichas células una pluralidad de ARN antisentido para dicha proteína preseleccionada, cada uno proporcionado según los métodos mencionados anteriormente, en el que dicha pluralidad de ARN antisentido para dicha al menos una proteína preseleccionada se une esencialmente a todos los transcritos de ARNm de dicha al menos una proteína preseleccionada. La proteína preseleccionada puede ser una forma con corte y empalme alternativo de un producto génico. Siguiendo líneas similares, se proporciona un método para generar un animal transgénico no humano que es un mutante con expresión funcionalmente nula de al menos una proteína preseleccionada que comprende llevar a cabo las etapas descritas anteriormente en la presente memoria utilizando células madre embrionarias distintas de las células derivadas de células madre embrionarias humanas obtenidas exclusivamente por un método que necesita la destrucción de un embrión, determinando la viabilidad de dichas células madre con expresión funcionalmente nula de dicha proteína preseleccionada y usando dichas células madre embrionarias viables para producir dicho animal transgénico no humano.

Asimismo, se describe un método para generar una línea celular con expresión funcionalmente nula de al menos una proteína y que sobreexpresa al menos una proteína distinta que comprende llevar a cabo los método de la presente memoria en las mismas células. De manera similar, se describe un método para generar una línea celular que expresa un ARN antisentido leal bajo el control de un promotor inducible llevando a cabo el método de la presente memoria en el que la etapa de transfección se realiza en presencia de una cantidad mínima de un inductor.

En la presente memoria se describe un método para identificar eventos genéticos de recombinación en células vivas que comprende las etapas de:

a) exponer una célula a una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con una secuencia de ARN seleccionada del grupo que consiste en la transcrita a partir de una secuencia recombinada y la transcrita a partir de la secuencia no recombinada; y

b) detectar dichas células que expresan dicha secuencia de ARN.

También se describe una nueva forma de baliza molecular que, a diferencia de las propiedades fluorescentes presentadas por balizas moleculares de la técnica anterior después de la unión a sus ácidos nucleicos diana, presenta actividad proteolítica después de dicha unión. Dicha actividad proteolítica puede usarse para propósitos de detección, pero también para degradar secuencias proteicas particulares en una célula si el ARNm que codifica la proteína está presente en la célula. Por ejemplo, una proteasa que escinde específicamente una proteína viral puede activarse si la transcripción del virus se activa, como en una infección latente.

Preferiblemente, el inhibidor de la enzima proteolítica es un péptido, aunque también son útiles otras moléculas incluyendo metales y quelantes de metales, para proporcionar la inhibición reversible de la enzima después de la interacción con el inhibidor. Los ejemplos de parejas útiles de enzimas proteolíticas e inhibidores de la enzima proteolítica incluyen pero no están limitados a aminopeptidasa y amastatina, proteasas de cisteína semejantes a tripsina y antipaína, aminopeptidasa y bestatina, proteasas de cisteína semejantes a quimiotripsina y quimiostatina, aminopeptidasa y diprotina A o B, carboxipeptidasa A y EDTA, proteasas de serina semejantes a elastasa y elastinal, y termolisina o aminopeptidasa M y 1,10-fenantrolina. La presente invención puede entenderse mejor por referencia a los Ejemplos no limitativos siguientes, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los ejemplos siguientes se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplo 1

Protocolo General. Material de Partida: las Balizas Moleculares pueden introducirse en células que no están expresando ningún ARN a partir de plásmidos o pueden usarse para detectar mensajes de ARN codificados a partir de plásmidos. El método de introducción de las balizas en cualquiera de estos dos tipos de células es idéntico. El protocolo siguiente sólo requiere que las células que se van a analizar se puedan separar entre sí y sean susceptibles de análisis FACS.

1) Como se describe más en profundidad en la descripción de la invención, las balizas pueden usarse conjuntamente con FACS para separar las células de un tejido tomando como base la expresión o ausencia de expresión en las células de ARN específicos. Para este fin, las células deben separarse en primer lugar entre sí por métodos estándar y bien establecidos tales como homogeneización y tratamiento químico adicional. Las balizas apropiadas pueden introducirse entonces en dichas células según el protocolo siguiente.

2) En segundo lugar, se pueden usar balizas para seleccionar células que expresan ARN particulares codificados por plásmidos que se han transfectado en una población de células. Para este fin, se debe transfectar en primer lugar en un cultivo de células un plásmido o plásmidos que codifican los ARN deseados. Pueden generarse entonces balizas para reconocer estos ARN, como se describe con más detalle en la descripción de la invención. La transfección de los plásmidos en las células puede conseguirse mediante una gran variedad de métodos usando bien reactivos propios o kits obtenidos de firmas biotécnicas (Qiagen, Promega, Geneporter, Invitrogen, Stratagene, etc.), según las instrucciones de los fabricantes. Los plásmidos deben elegirse de manera que cada uno confiera resistencia a un antibiótico. Después de de estos plásmidos en las células y un periodo breve para la recuperación de las células (habitualmente 24 horas), las células se someterán a los antibióticos apropiados de manera que sólo

sobrevivirán aquellas células a las que los plásmidos han conferido resistencia al antibiótico. Esto tarda generalmente tres o cuatro días, dependiendo tanto del tipo célular como del antibiótico usado.

El resultado es que un conjunto de células permanece y todas éstas serán resistentes a antibióticos, pero sólo una pequeña fracción de las cuales expresa los ARN de interés. Para seleccionar las células que expresan los ARN deseados, puede seguirse el protocolo siguiente.

Ejemplo 2

Selección de células usando balizas

1) Transfectar balizas en células: Las balizas deben diseñarse de manera que reconozcan el ARN deseado bien hibridando con una secuencia endógena en el ARN o hibridando con una etiqueta que se añade a la secuencia nativa de ARN. El diseño de las balizas se elabora tomando como base la descripción de la invención.

La transfección puede llevarse a cabo por una gran variedad de métodos, de manera similar a la transfección de plásmidos en células. El método empleado debe elegirse tomando como base el tipo de células que se está usando ya que algunas células responden mejor a algunos métodos de transfección sobre otros métodos. La transfección debe realizarse según las instrucciones del fabricante del reactivo de transfección usado.

La transfección de balizas en células puede llevarse a cabo bien en células en suspensión o en células que crecen en superficies sólidas, dependiendo del reactivo de transfección usado.

2) Después de la transfección de las balizas en las células, las células pueden someterse a análisis FACS. FACS puede usarse para separar las células positivas para una cualquiera o más de las balizas usadas. También puede usarse para separar las células tomando como base la intensidad de la señal de las balizas, permitiendo de esta manera que el investigador seleccione las células que expresan ARN en diferentes grados.

Ejemplo 3

Generación de líneas celulares que expresan uno o más ARN

Después de la selección por FACS, las células con calificación positiva pueden mantenerse en medio apropiado como se describe con más detalle en la descripción de la invención. Estas células darán lugar a líneas celulares que expresan los ARN de interés.

Concentración de la Baliza: La concentración de la baliza que se va a usar depende de varios factores. Por ejemplo, se debe considerar la abundancia en las células del ARN que se va a detectar y la accesibilidad de este ARN para la baliza. Por ejemplo, si el ARN que se va a detectar está presente en cantidades muy bajas o si se encuentra en una parte del ARN que no es fácilmente accesible tomando como base el plegamiento tridimensional del ARN, debe usarse más baliza aquí que en los casos en los que el ARN que se va a detectar es muy abundante y en los que el sitio reconocido por la baliza es totalmente accesible. La cantidad exacta de baliza que se va a usar se tendrá que determinar empíricamente para cada aplicación.

Esto puede conseguirse introduciendo diferentes cantidades de balizas en diferentes grupos de células y seleccionando la condición en la que la fluorescencia de fondo sea baja y en la que la señal sea alta (la condición en la que no todas sino algunas células tienen calificación positiva para la baliza).

La invención también describe los ítems siguientes:

1. Un método para generar una línea celular que expresa al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar líneas celulares con al menos una construcción de ADN que codifica dicha al menos una proteína preseleccionada y al menos un marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células seleccionadas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de dicha al menos una proteína preseleccionada;

d) aislar las células que fluorescen;

e) generar una línea celular que expresa dicha al menos una proteína preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

2. El método del ítem 1 en el que el aislamiento de dichas células que fluorescen se lleva a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia.

3. El método del ítem 1, en el que dicha línea celular expresa una segunda proteína preseleccionada, incluyendo además dichas etapas transfectar dicha línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica una segunda proteína preseleccionada y un marcador de resistencia a fármacos; seleccionar las células que expresan dicho segundo marcador; exponer dichas células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de dicha segunda proteína preseleccionada y aislar las células que presentan fluorescencia de cada uno de dichos al menos uno y dicho segundo transcritos de ARNm.

4. El método del ítem 3 en el que dicha etapa se realiza bien simultáneamente o secuencialmente.

5. Un método para generar una línea celular que expresa al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con al menos una construcción de ADN que codifica dicha al menos una proteína preseleccionada, al menos un marcador de resistencia a fármacos y al menos una primera etiqueta de epítopo ;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el transcrito de ARN de dicha primera etiqueta de epítopo:

d) aislar dichas células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa dicha al menos una proteína preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

6. El método del ítem 5 en el que dicho aislamiento de dichas células que fluorescen se lleva a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia.

7. El método del ítem 5, en el que la parte de ADN de la construcción que codifica dicha etiqueta de epítopo está en marco con la parte de la construcción de ADN que codifica dicha al menos una proteína.

8. El método del ítem 5, en el que la parte de la secuencia de ADN que codifica dicha etiqueta de epítopo está fuera de marco con la parte de la secuencia de ADN que codifica dicha al menos una proteína.

9. El método del ítem 5, en el que dicha línea celular expresa al menos una segunda proteína preseleccionada; incluyendo además dichas etapas transfectar dicha línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica dicha segunda proteína preseleccionada, un segundo marcador de resistencia a fármacos y una segunda etiqueta de epítopo, seleccionar las células que expresan dicho segundo marcador; exponer dichas células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con el transcrito de ARN de dicha segunda etiqueta de epítopo y aislar dichas células que presentan florescencia de cada una de dicha primera y dicha segunda etiqueta de epítopo.

10. El método del ítem 9, en el que la parte de la secuencia de ADN que codifica dicha segunda etiqueta de epítopo está en marco con la parte de la secuencia de ADN que codifica dicha segunda proteína.

11. El método del ítem 9, en el que la parte de la secuencia de ADN que codifica dicha segunda etiqueta de epítopo está fuera de marco con la parte de la secuencia de ADN que codifica dicha segunda proteína.

12. Un método para generar una línea celular que expresa al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con una construcción de ADN que codifica dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada y al menos un gen de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células a una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicha molécula de ARN antisentido;

d) aislar dichas células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa dicha secuencia de ARN antisentido preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

13. El método del ítem 12 en el que el aislamiento de dichas células que fluorescen se lleva a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia.

14. El método del ítem 12, en el que dicha línea celular expresa al menos una segunda molécula de ARN antisentido preseleccionada, incluyendo además dichas etapas transfectar dicha línea celular con una segunda construcción de

ADN que codifica una segunda molécula de ARN antisentido preseleccionada y un segundo marcador de resistencia a fármacos; seleccionar células que expresan dicho segundo marcador; exponer dichas células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicha segunda molécula de ARN antisentido; y aislar las células que presentan fluorescencia de cada una de dicho al menos uno y dicho segundo transcritos de ARNm.

15. Un método para generar una línea celular que expresa al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada que comprende las etapas de:

a) transfectar una línea celular con una construcción de ADN que codifica dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada, al menos un marcador de resistencia a fármacos y una primera secuencia de nucleótidos de etiqueta de epítopo;

b) seleccionar las células resistentes a un fármaco frente al que dicho marcador confiere resistencia, transcribiendo dichas células la al menos una construcción de ADN y el al menos un marcador de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células seleccionadas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARNm de dicha primera etiqueta de epítopo;

d) aislar dichas células que fluorescen; y

e) generar una línea celular que expresa dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

16. El método del ítem 15 en el que dicha línea celular expresa al menos una segunda proteína preseleccionada, incluyendo además dichas etapas transfectar dicha línea celular con una segunda construcción de ADN que codifica una segunda molécula de ARN antisentido preseleccionada un segundo marcador de resistencia a fármacos; seleccionar las células que expresan dicho segundo marcador; exponer dichas células a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARN de dicha segunda etiqueta de epítopo; y aislar las células que presentan fluorescencia de ambos de dicho al menos uno y dicho segundo transcritos de ARNm.

17. El método del ítem 16 en el que dichas etapas relacionadas con dicha segunda proteína preseleccionada se realizan en dicha línea celular que expresa dicha primera molécula de ARN antisentido.

18. Un método para aislar células que expresan al menos una proteína que comprende las etapas de:

a) proporcionar células que se sospecha que expresan dicha al menos una proteína;

b) exponer dichas células a al menos una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARNm que codifica dicha al menos una proteína;

c) aislar dichas células que fluorescen.

19. El método del ítem 18 en el que dicho aislamiento de dichas células que fluorescen se lleva a cabo usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia.

20. El método del ítem 8 en el que dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en una proteína localizada en la superficie celular y una proteína intracelular.

21. El método del ítem 18, en el que dichas células expresan una segunda proteína, una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con un transcrito de ARNm que codifica dicha segunda proteína se expone a dichas células, se aíslan las células que tienen fluorescencia de cada una de dicha primera y segunda balizas moleculares.

22. Un método para cuantificar el nivel de expresión de al menos un transcrito de ARN en una muestra biológica que comprende las etapas de:

a) exponer dicha muestra biológica a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho transcrito de ARN;

b) cuantificar el nivel de fluorescencia en dicha muestra biológica; y

c) correlacionar dicho nivel de fluorescencia con dicho nivel de dicho al menos un transcrito de ARNm.

23. El método del ítem 22, en el que dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en muestra celular y una muestra de tejido.

24. El método del ítem 22 en el que dicho transcrito de ARN se selecciona del grupo que consiste en ARN que codifica una proteína, un ARN estructural y un ARN antisentido.

25. El método del ítem 22, en el que dicha muestra biológica está fijada.

26. El método del ítem 22, en el que dicha fluorescencia se cuantifica por microscopía de fluorescencia o tecnología de separación de células activada por fluorescencia.

27. El método del ítem 21, en el que el nivel de expresión de al menos un segundo transcrito de ARN se cuantifica en dicha muestra biológica usando una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho segundo transcrito de ARN.

28. El método del ítem 21 ó 22 en el que dichas células que expresan dicho ARN se aíslan usando tecnología de separación de células activada por fluorescencia.

29. Un método para generar una línea celular que sobreexpresa al menos una proteína que comprende las etapas de:

a) transfectar células con al menos dos secuencias de ADN, teniendo cada una de dichas secuencias una parte que codifica dicha proteína, al menos una etiqueta de epítopo y al menos un marcador de resistencia a fármacos; y una parte que codifica dicha proteína, al menos una segunda etiqueta de epítopo y al menos un segundo marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células transfectadas con dichas al menos dos secuencias de ADN por expresión de dicho primer y dicho segundo marcadores de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células seleccionadas a una primera y una segunda baliza molecular, cada una que fluoresce después de hibridar con las secuencias de nucleótidos de los transcritos de ARN de dicha primera y dicha segunda etiquetas de epítopo respectivamente;

d) aislar dichas células que presentan fluorescencia de cada una de dicha primera y segunda balizas moleculares; y

e) generar una línea celular que sobreexpresa dicha al menos una proteína preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

30. El método del ítem 29 en el que dichas al menos dos secuencias de ADN residen en la misma construcción.

31. El método del ítem 29 en el que dicha primera y dicha segunda etiquetas de epítopo están cada una independientemente en marco o fuera de marco con dicha proteína.

32. Un método para generar una línea celular que sobreexpresa al menos una molécula de ARN antisentido que comprende las etapas de:

a) transfectar células con al menos dos secuencias de ADN, teniendo cada una de dichas secuencias una parte que codifica dicha molécula de ARN antisentido, al menos una etiqueta de epítopo y al menos un marcador de resistencia a fármacos; y una parte que codifica dicha molécula de ARN antisentido, al menos una segunda etiqueta de epítopo y al menos un segundo marcador de resistencia a fármacos;

b) seleccionar las células transfectadas con dichas al menos dos secuencias de ADN por expresión de dicho primer y dicho segundo marcadores de resistencia a fármacos;

c) exponer dichas células seleccionadas a una primera y una segunda baliza molecular, cada una que fluoresce después de hibridar con las secuencias de nucleótidos de los transcritos de ARN de dicha primera y dicha segunda etiquetas de epítopo respectivamente;

d) aislar dichas células que presentan fluorescencia de cada una de dicha primera y segunda balizas moleculares; y

e) generar una línea celular que sobreexpresa dicha al menos una molécula de ARN antisentido preseleccionada creciendo dichas células aisladas.

33. El método del ítem 32 en el que dichas al menos dos secuencias de ADN residen en la misma construcción.

34. El método del ítem 32 en el que dicha primera y dicha segunda etiquetas de epítopo están cada una independientemente en marco o fuera de marco con dicha molécula de ARN antisentido.

35. Un método para generar células funcionalmente nulas para expresión de al menos una proteína preseleccionada que comprende las etapas de proporcionar en dichas células una pluralidad de ARN antisentido frente a dicha proteína preseleccionada, cada uno proporcionado según el ítem 12 ó 15, en el que dicha pluralidad de ARN antisentido frente a dicha al menos una proteína preseleccionada se une esencialmente a todos los transcritos de ARNm de dicha al menos una proteína preseleccionada.

36, El método del ítem 35, en el que dicha proteína preseleccionada es una forma con corte y empalme alternativo de un producto génico.

37. Un método para generar un animal transgénico no humano que es un mutante con expresión funcionalmente nula de al menos una proteína preseleccionada que comprende llevar a cabo las etapas del ítem 32 ó 35 utilizando células madre embrionarias no humanas, determinar la viabilidad de dichas células madre con expresión funcionalmente nula de dicha proteína preseleccionada y usar dichas células madre embrionarias viables para producir dicho animal transgénico.

38. Un método para generar una línea celular con expresión funcionalmente nula de al menos una proteína y que sobreexpresa al menos otra proteína que comprende llevar a cabo los métodos del ítem 1 ó 5 e ítem 12 ó 15 en las mismas células.

39. Un método para generar una línea celular que expresa un ARN antisentido letal bajo el control de un promotor inducible llevando a cabo el método de los ítems 12 ó 15 en el que la etapa (a) se realiza en presencia de una cantidad mínima de un inductor.

40. Un método para identificar eventos genéticos de recombinación en células vivas que comprende las etapas de:

a) exponer una célula a una baliza molecular que fluoresce después de hibridar con una secuencia de ARN seleccionada del grupo que consiste en la forma transcrita a partir de una secuencia recombinada y la transcrita a partir de una secuencia no recombinada;

b) detectar dicha célula que expresa dicha secuencia de ARN.

41. Una sonda de hibridación unitaria que genera actividad proteolítica útil en un ensayo que tiene condiciones que incluyen una temperatura de detección para detectar al menos una cadena de ácido nucleico que contiene una secuencia de ácido nucleico diana preseleccionada, comprendiendo dicha sonda:

una secuencia complemento diana monocatenaria que es complementaria a la secuencia diana;

flanqueando la secuencia complemento diana, una pareja de brazos de oligonucleótido que consisten en una secuencia de brazo 5' unida covalentemente a dicho extremo 5' y una secuencia de brazo 3' unida covalentemente a dicho extremo 3', formando dicha pareja de brazos de oligonucleótidos un dúplex de tallo,

una pareja de interacción que comprende una enzima proteolítica y un inhibidor de dicha enzima proteolítica, un miembro de cada pareja conjugado con la secuencia de brazo 5' y el otro miembro conjugado con la secuencia de brazo 3', en el que dicho inhibidor es capaz de inactivar la actividad proteolítica de dicha enzima proteolítica cuando interacciona con ella;

teniendo dicha sonda, en dichas condiciones de ensayo en ausencia de dicha secuencia diana, una actividad proteolítica característica cuyo nivel es función del grado de interacción de dicho primer y segundo restos marcadores,

en el que en las condiciones en presencia de un exceso de dicha secuencia diana, la hibridación de la secuencia complemento diana a la secuencia diana incrementa el nivel de dicha actividad proteolítica característica.

42. La sonda del ítem 41 en el que dicho inhibidor de la enzima proteolítica es un péptido.

43. La sonda del ítem 41 en el que dicha enzima proteolítica y dicho inhibidor de dicha enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en aminopeptidasa y amastatina, proteasas de cisteína semejantes a tripsina y antipaína, aminopeptidasa y bestatina, proteasas de cisteína semejantes a quimiotripsina y quimiostatina, aminopeptidasa y diprotina A o B, carboxipeptidasa A y EDTA, proteasas de serina semejantes a elastasa y elastinal y termolisina o aminopeptidasa M y 1,10-fenantrolina.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar líneas celulares que expresan un primer ARN de interés, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar células vivas que se sospecha que expresan dicho primer ARN de interés;

(b) exponer dichas células vivas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho primer ARN de interés;

(c) detectar las células que presentan fluorescencia de dicha primera baliza molecular;

(d) aislar dichas células detectadas que fluorescen; y

(e) generar líneas celulares a partir de las células aisladas.

2. Un método para aislar células vivas que expresan al menos dos ARN de interés, que comprende las etapas de:

(a) introducir en células vivas ADN que codifica un primer ARN de interés y ADN que codifica un segundo ARN de interés;

(b) exponer dichas células vivas a una primera baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho primer ARN de interés;

(c) exponer dichas células vivas a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho segundo ARN de interés;

(d) detectar las células que presentan fluorescencia de ambas dicha primera baliza molecular y dicha segunda baliza molecular; y

(e) aislar dichas células detectadas que fluorescen.

3. El método de la reivindicación 1, en el que se sospecha que dichas células vivas expresan un segundo ARN de interés y en el que dicho método comprende además las etapas de:

(f) exponer dichas células vivas a una segunda baliza molecular que fluoresce después de hibridar con dicho segundo ARN de interés; y

(g) detectar las células que presentan fluorescencia de dicha segunda baliza molecular.

4. El método de la reivindicación 2, en el que las etapas de introducir el ADN en las células vivas, exponer las células vivas a una baliza molecular y detectar las células que fluorescen se realizan bien simultáneamente o secuencialmente para el primer y segundo ARN de interés.

5. El método de la reivindicación 3, en el que cualquiera de las etapas de exponer las células vivas a una baliza molecular y detectar las células que fluorescen se realizan bien simultáneamente o secuencialmente para el primer y segundo ARN de interés.

6. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que la primera y segunda balizas moleculares comprenden diferentes fluoróforos.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5, en el que cualquiera de dichos ARN de interés se expresan a partir de un gen endógeno.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que cualquiera de dichos ARN de interés se seleccionan del grupo que consiste en ARN estructurales, ARN antisentido, ARNr, ARNhn, ARNsn y ARNm.

9. El método de la reivindicación 8, en el que cualquiera de dichos ARN de interés codifican una proteína de la superficie celular.

10. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho primer ARN de interés y dicho segundo ARN de interés, o las proteínas codificadas por dichos ARN, están implicados en la formación de un complejo.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además las etapas de cuantificar el nivel de fluorescencia de cualquiera de dichas balizas moleculares y correlacionar el nivel de fluorescencia con el nivel del ARN de interés con el que hibrida la baliza molecular.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicha fluorescencia se detecta por microscopía de fluorescencia o tecnología de separación de células activada por fluorescencia.

13. El método de la reivindicación 2, que comprende además generar una línea celular a partir de las células aisladas.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que las células vivas aisladas son células madre embrionarias, con la condición de que se excluyen las células madre que derivan de células madre embrionarias humanas obtenidas exclusivamente por un método que necesita la destrucción de un embrión.

15. Un método para generar un animal transgénico no humano que expresa al menos un primer ARN de interés, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar las células madre embrionarias aisladas en la reivindicación 14, y

(b) usar las células madre embrionarias para producir dicho animal transgénico no humano.