



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 326**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02760417 .2**

86 Fecha de presentación : **12.09.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1432819**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

54 Título: **Procedimiento para determinar la posición en el ciclo celular.**

30 Prioridad: **05.10.2001 GB 0123856**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

73 Titular/es: **GE Healthcare UK Limited**
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, GB
Cancer Research Technology Limited

72 Inventor/es: **Pines, Jonathon Noe;**
Thomas, Nicholas;
Jones, Anne Elizabeth;
Goodyer, Ian David;
Francis, Michael John;
Ismail, Rahman Aziz y
Kendall, Jonathan Mark

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento para determinar la posición en el ciclo celular.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento nuevo, no destructivo y dinámico para determinar la posición en el ciclo celular de células vivas.

10 **Antecedentes de la invención**

La división de células eucariotas tiene lugar a través de un ciclo celular altamente regulado que comprende fases consecutivas denominadas G1, S, G2 y M. La interrupción del ciclo celular o del control del ciclo celular puede dar como resultado anomalías celulares o estados de enfermedad tales como cáncer que surgen de múltiples cambios genéticos que transforman células con crecimiento limitado en células muy invasivas que no responden al control normal del crecimiento. La transición de células normales a células cancerosas puede surgir por la pérdida de la función correcta en la replicación del ADN y los mecanismos de reparación de ADN. Todas las células que se dividen están sometidas a un número de mecanismos de control, conocidos como puntos de control del ciclo celular, que mantienen la integridad genómica deteniendo o induciendo la destrucción de células aberrantes. La investigación de la progresión y control del ciclo celular es por consiguiente de gran interés en el diseño de fármacos anticáncer. (Flatt, P. M. y Pietenpol, J. A. Drug Metab. Rev. (2000), 32(3-4), 283-305; Buolamwini, J. K. Current Pharmaceutical Design, (2000), 6, 379-392).

La determinación precisa del estado del ciclo celular es un requerimiento clave para investigar procesos celulares que afectan al ciclo celular o que dependen de la posición en el ciclo celular. Tales medidas son particularmente vitales en las aplicaciones de selección de fármacos en las que:

- i) se desean sustancias que modifican la progresión del ciclo celular directa o indirectamente; por ejemplo, para investigación como potenciales tratamientos anticáncer;
- ii) deben comprobarse los efectos no deseados en el ciclo celular de los candidatos a fármacos; y/o
- iii) se sospecha que un agente es activo o inactivo hacia células en una fase particular del ciclo celular.

Tradicionalmente, se ha determinado el estado del ciclo celular para poblaciones celulares por medio de citometría de flujo usando tinciones fluorescentes que tiñen el contenido de ADN del núcleo celular (Barlogie, B. y col., Cancer Res., (1983), 43(9), 3982-3997). La citometría de flujo da una información cuantitativa del contenido de ADN de las células y por consiguiente permite la determinación de los números relativos de células en las fases G1, S y G2 + M del ciclo celular. Sin embargo, este análisis es un procedimiento destructivo, no dinámico y requiere la toma de muestra en serie de una población para determinar el estado del ciclo celular con el tiempo. Además, las técnicas convencionales de citometría de flujo examinan el total de la población celular en una muestra y dan datos limitados en células individuales, lo que excluye el estudio del estado del ciclo celular de diferentes tipos celulares que pueden estar presentes dentro de la muestra bajo análisis.

El documento EP 798386 describe un procedimiento para el análisis del ciclo celular en subpoblaciones celulares presentes en muestras celulares heterogéneas. Este procedimiento usa la incubación secuencial de la muestra con anticuerpos monoclonales marcados fluorescentemente para identificar tipos celulares específicos y un fluorocromo que se une específicamente a los ácidos nucleicos. Esto permite la determinación de la distribución en el ciclo celular de subpoblaciones de células presentes en la muestra. Sin embargo, como este procedimiento usa citometría de flujo, continúa dando sólo datos no dinámicos y requiere la realización de medidas en serie en muestras separadas de células para determinar variaciones en el estado del ciclo celular de una población celular con el tiempo tras la exposición a un agente bajo investigación para los efectos en la progresión del ciclo celular.

Otra desventaja de las técnicas de citometría de flujo se refiere a la asignación indirecta, e inferida de la posición en el ciclo celular de las células en base al contenido de ADN. Dado que el contenido de ADN de los núcleos celulares varía a través del ciclo celular en una manera razonablemente predecible, por ejemplo las células en G2 o M tienen el doble de contenido de ADN que las células en G1, y las células que están realizando síntesis de ADN en fase S tienen una cantidad intermedia de ADN, es posible controlar la distribución relativa de células entre diferentes fases del ciclo celular. Sin embargo, la técnica no permite precisión en la determinación de la posición en el ciclo celular de cualquier célula individual debido a la ambigüedad en la asignación de células a las fases G2 o M y a más imprecisión que surge de la variación inherente en el contenido de ADN entre célula y célula dentro de una población que puede excluir la discriminación precisa entre células que están cerca de los límites entre fases adyacentes del ciclo celular. Además, las variaciones en el contenido de ADN y la tinción del ADN entre diferentes tipos celulares de diferentes tejidos u organismos requieren que la técnica esté optimizada para cada tipo celular, y puede complicar las comparaciones directas de datos entre tipos de células o entre experimentos (Herman, Cancer (1992), 68(6), 1553-1556). Por consiguiente, la citometría de flujo es adecuada para examinar la distribución total del ciclo celular de células dentro de una población, pero no puede usarse para controlar el estado preciso del ciclo celular de una célula individual con el tiempo.

La progresión del ciclo celular está ajustadamente controlada por la expresión temporal y espacial definida, localización y destrucción de un número de reguladores del ciclo celular que exhiben un comportamiento altamente dinámico durante el ciclo celular (Pines, J., *Nature Cell Biology*, (1999), 1, E73-E79). Por ejemplo, en etapas específicas del ciclo celular algunas proteínas traslocan desde el núcleo hacia el citoplasma, o viceversa, y algunas se degradan rápidamente. Para detalles de componentes de control e interacciones del ciclo celular conocidos, véase Kohn, *Molecular Biology of the Cell* (1999), 10, 2703-2734.

Uno de los reguladores del ciclo celular más ampliamente caracterizados en células humanas es la ciclina B1, cuya expresión y destrucción temporal y espacial controla la transición de la célula de G2 a M y su salida de M. La expresión de ciclina B1 está dirigida por un promotor específico de fase del ciclo celular que inicia la expresión al final de la fase S y llega a un pico durante G2. Una vez expresada, esta proteína se traslada constantemente entre el núcleo y el citoplasma durante la fase G2, pero es principalmente citoplasmática porque su tasa de exportación es mucho mayor que la de importación. Al comienzo de la mitosis, la ciclina B1 transloca rápidamente dentro del núcleo, cuando su tasa de importación aumenta sustancialmente, y disminuye su exportación, de una manera dependiente de fosforilación (Figura 1). Por consiguiente, la localización de la ciclina B1 en la célula puede usarse para marcar la transición de la fase G2 a mitosis. Una vez que la célula alcanza la metafase, o, más precisamente, cuando se satisface el punto de control de montado de husos, la ciclina B1 se degrada rápidamente. La destrucción de ciclina B1 continúa durante la siguiente fase G1 pero se detiene una vez que la célula comienza la replicación de ADN. Estos acontecimientos se han visualizado en tiempo real por microinyección de ciclina B1 marcada fluorescentemente en células vivas (Clute y Pines, *Nature Cell Biology*, (1999), 1, 82-87).

Los elementos que controlan la expresión y la destrucción temporales han sido dilucidados en una serie de estudios. Se ha mostrado que la biosíntesis de ciclina B1 es controlada a nivel de la transcripción por una secuencia promotora que confina la expresión hacia las fases S tardía y G2 del ciclo celular (Piaggio y col., *Exp. Cell Research*, (1995), 216, 396-402; Cogswell y col., *Mol. Cell. Biology*, (1995), 15, 2782-2790). Se ha mostrado que la destrucción de ciclina B1 en el momento adecuado en fase M está controlada por una secuencia de 9 aminoácidos, denominada caja de la destrucción (caja D) que apunta a la proteína para proteólisis vía ubiquitinilación. La expresión de una proteína ciclina de fusión B-GFP de *Drosophila* dirigida por un promotor constitutivo de poliubiquitina (Huang y Raff, *EMBO Journal*, (1999), 18 (8), 2184-2195) ha mostrado que la ciclina B marcada fluorescentemente imita el comportamiento de la ciclina B endógena en ser degradada en el final de la metafase. Estudios (Hagting y col., *Current Biology*, (1999), 9, 680-689) que usan ciclina B1-GFP humana han mostrado que los cambios temporales en la localización citoplasmática y nuclear de la ciclina B1 con la progresión del ciclo celular es dependiente de una señal nuclear de exportación (NES), cuya fosforilación conduce a la importación nuclear.

Otros puntos de control del ciclo celular se regulan de manera similar por mecanismos de control temporal y espacial y muchos de los componentes e interrelaciones han sido dilucidadas (Pines, J., *Nature Cell Biology* (1999), 1, E73-E79).

Se han descrito una serie de procedimientos que hacen uso de ciertos componentes de los mecanismos de control del ciclo celular para proporcionar procedimientos que analizan o explotan el estado de proliferación celular.

Mateus, C. y Avery, S. (*Yeast* (2000), 16, 1313-1323) describen la expresión de una proteína GFP desestabilizada en levadura como gen informador para estudiar la expresión genética mediada por el ciclo celular. La construcción está constituida por una GFP fusionada al dominio PEST del extremo C terminal de la ciclina CLN2 G1 de levadura y expresada bajo el control del promotor de CLN2. Cuando se expresa en cultivos síncronos de células de levadura se observó que esta construcción da una cinética de expresión coherente con aquella informada previamente para CLN2; la aparición de GFP vía activación del promotor de CLN2 y degradación de la GFP desestabilizada vía degradación dependiente de ubiquitina.

El documento WO 00/29602 describe el uso de un promotor de ciclina A para dirigir la expresión de GFP como un marcador seleccionable para la división de células madre transgénicas para permitir que las células en división sean aisladas de un fondo de células que no se dividen por clasificación de células activadas por fluorescencia. Mientras que este procedimiento permite la identificación y la selección de células que han progresado más allá de cierta etapa en el ciclo celular, no da información sobre el estado del ciclo celular de ninguna célula dada, con excepción de la información histórica de que la célula ha pasado o no ha pasado por la fase G2 del ciclo celular en un cierto tiempo en el pasado.

El documento US 6048693 describe un procedimiento para seleccionar compuestos que afectan las proteínas reguladoras del ciclo celular, en el que la expresión de un gen informador está unida a los elementos de control que actúan por acción de ciclinas u otras proteínas de control del celular. En este procedimiento, la expresión temporal de un producto de un gen informador se dirige de una manera específica del ciclo celular y los compuestos que actúan sobre uno o más componentes de control del celular pueden aumentar o disminuir los niveles de expresión. Puesto que el sistema del ensayo no contiene ningún elemento para la destrucción del producto de gen informador ni para la destrucción de cualquier señal que se surja del gene informador, el procedimiento no puede dar información sobre el posición dentro del ciclo celular de cualquier célula en el ensayo e informa solamente sobre perturbaciones generales de los mecanismos de control del ciclo celular.

Los documentos US 5849508 y US 6103887 describen procedimientos para determinar el estado proliferativo de células por medio de anticuerpos que se unen a ciclina A. Estos procedimientos proporcionan los medios para determinar el porcentaje de células en proliferación en una población de prueba con relación a una población del control.

El documento US 6159691 se refiere a un procedimiento para ensayar reguladores supuestos de la progresión del ciclo celular. En este procedimiento, se usan señales de localización nuclear (NLS) derivadas de los factores de transcripción específicos de las fases del ciclo celular DP-3 y E2F- 1 para ensayar la actividad de los compuestos que actúan como agonistas o antagonistas para aumentar o para disminuir la localización nuclear de una NLS fusionada a un marcador detectable.

Una serie de investigadores han estudiado el ciclo celular usando las moléculas informadoras tradicionales que requieren que las células sean fijadas o lisadas. Por ejemplo Hauser y Bauer (Plant and Soil, 2000, 226, pág.1-10) usaron β -glucuronidasa (GUS) para estudiar la división celular en un meristema de planta y Brandeis y Hunt (EMBO J., 1996, vol. 15, pág. 5280-5289) usaron proteínas de fusión de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) para estudiar variaciones en los niveles de ciclina. Aunque estos procedimientos proporcionan medios para estudiar la posición dentro del ciclo celular de una célula particular (usando GUS) o el estado medio del ciclo celular de una población de las células (usando CAT) ambos procedimientos son destructivos. Ninguno de los dos procedimientos permite el análisis repetido de una célula específica en el tiempo y por consiguiente no son convenientes para seguir la progresión de una célula a través del ciclo celular.

Ninguno de los procedimientos precedentes, que usan componentes del mecanismo de control del ciclo celular, proporcionan los medios para determinar el estado del ciclo celular de una célula individual o de una población de células. Por consiguiente, se necesitan procedimientos que permitan la determinación de la posición dentro del ciclo celular de una única célula viva de manera no destructiva, que permita investigar la misma célula en repetidas ocasiones en el tiempo, y que permitan el estudio de los efectos de agentes con efectos potencialmente deseados o indeseados sobre el ciclo celular. Además, resulta deseable determinar la posición dentro del ciclo celular a partir de una sonda controlada directamente por los componentes de control del ciclo celular, más que indirectamente a través de contenido de ADN o de otros marcadores indirectos posición en el ciclo celular como se describió anteriormente. La presente invención describe un procedimiento que usa componentes clave de la maquinaria reguladora del ciclo celular en combinaciones definidas para proporcionar medios para determinar el estado del ciclo celular para células vivas individuales de mamífero en un procedimiento no destructivo que proporciona lecturas dinámicas de resultados.

La presente invención proporciona construcciones de ADN, y líneas celulares que contienen tales construcciones, que exhiben activación y destrucción de una molécula informadora detectable de una manera específica de las fases del ciclo celular, por unión directa de la señal informadora que cambia a expresión y destrucción temporal y espacial de los componentes del ciclo celular. Esto mejora notablemente la precisión de la determinación del estado de la fase del ciclo celular y permite el control continuo de la progresión del ciclo celular en células individuales. Además, se ha encontrado que pueden aislarse los elementos de control claves y abstraerse de los elementos funcionales del mecanismo de control del ciclo celular para permitir el diseño de informadores de las fases del ciclo celular que están regulados dinámicamente y funcionan conjuntamente con los componentes endógenos del control del ciclo celular, pero independientemente de ellos, y proporcionan por lo tanto los medios para controlar la posición dentro del ciclo celular sin influenciar o interferir con la progresión natural del ciclo celular.

Resumen de la invención

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona una construcción de informador de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora detectable de célula viva unida operativamente a y bajo el control de:

- i) al menos un elemento de control de expresión específico de fase del ciclo celular,
- ii) un elemento de control de destrucción, y
- iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular,

definiendo expresión como todos los procedimientos involucrados en la biosíntesis de una proteína a partir de un gen. Se entenderá además que el término "célula viva", en relación con moléculas informadoras, define a una molécula informadora que produce una señal detectable en células vivas y por consiguiente es adecuada para uso en sistemas de detección por imágenes de células vivas.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para determinar la posición dentro del ciclo celular de una célula de mamífero que comprende:

a) expresar una construcción informadora de ácido nucleico en una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida operativamente a y bajo el control de:

- i) al menos un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción,

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular;

b) determinar la posición dentro del ciclo celular controlando las señales emitidas por la molécula informadora.

De manera adecuada, la construcción informadora de ácido nucleico es una construcción de ADN.

El elemento de control de expresión específico de fase del ciclo celular es típicamente una secuencia de ADN que controla la transcripción y/o traducción de una o más secuencias de ácidos nucleicos y permite el control de expresión específico del ciclo celular. Puede usarse adecuadamente cualquier elemento de control de expresión específicamente activo en una o más fases del ciclo celular para crear la construcción informadora de la posición en el ciclo.

De manera adecuada, el elemento de control de expresión específico de fase del ciclo celular puede seleccionarse de promotores específicos del ciclo celular y de otros elementos que influyen en el control de la transcripción o traducción de una manera específica del ciclo celular. Donde el elemento de control de expresión es un promotor, la elección del promotor dependerá de la fase del ciclo celular seleccionada para el estudio.

Los promotores adecuados incluyen: promotor de ciclina B1 (Cogswell y col., Mol. Cell Biol., (1995), 15(5), 2782-2790, Hwang y col., J. Biol. Chem., (1995), 270 (47), 28419-28424, Piaggio y col., Exp. Cell Res., (1995), 216 (2), 396-402); Promotor de Cdc25B (Korner y col., J. Biol. Chem., (2001), 276 (13), 9662-9669); promotor de ciclina A2 (Henglein y col., Proc. Nat. Acad. Sci. EEUU, (1994), 91 (12), 5490-5494, Zwicker y col., Embo J., (1995), 14(18), 4514-4522); promotor de Cdc2 (Tommasi y Pfeifer, Mol. Cell Biol., (1995), 15(12), 6901-6913, Zwicker y col., Embo J. (1995), 14(18), 4514-4522), promotor de Cdc25C (Korner y Muller, J. Biol. Chem., (2000), 275(25), 18676-18681, Korner y col., Nucl. Acids Res., (1997), 25(24), 4933-4939); promotor de ciclina E (Botz y col., Cell Biol. (1996), 16(7), 3401-3409, Korner y Muller, J. Biol. Chem., (2000), 275(25), 18676-18681); promotor de Cdc6 (Hateboer y col., Mol. Cell Biol., (1998), 18(11), 6679-6697, Yan y col., Proc. Nat. Acad. Sci. EEUU, (1998), 95(7), 3603-3608); promotor de DHFR (Shimada y col., J. Biol. Chem., (1986), 261(3), 1445-1452, Shimada y Nienhuis, J. Biol. Chem., (1985), 260(4), 2468-2474) y promotores de histonas (van Wijnen y col., Proc. Nat. Acad. Sci. EEUU, (1994), 91, 12882-12886).

De manera adecuada, el elemento de control de expresión específico de fase del ciclo celular puede seleccionarse de elementos IRES específicos del ciclo celular y de otros elementos que influyen en el control de la traducción de una manera específica del ciclo celular. Un elemento IRES es un sitio interno de entrada ribosomal que permite la unión de un ribosoma y que tenga lugar el inicio de la traducción en una región del ARNm que no es una región rematada en 5'. Un elemento IRES específico de ciclo celular restringe el inicio de la traducción independiente del remate a una etapa específica del ciclo celular (Sachs, A. B., Cell, (2000), 101, 243-245). Donde el elemento de control de expresión se selecciona para ser un IRES, su selección dependerá adecuadamente de la fase del ciclo celular bajo estudio. En este caso, puede usarse un promotor expresado de manera constitutiva (por ejemplo, CMV o SV40) o inducible (por ejemplo, sistema pTet-on pTet-off, Clontech) para controlar la transcripción del ARNm bicistrónico (Sachs, A. B., Cell, (2000), 101, 243-245). Como alternativa, puede usarse un elemento IRES no dependiente de las fases del ciclo celular (por ejemplo, los IRES de EMCV hallados en vectores pIRES, BD Clontech) conjuntamente con un elemento promotor específico del ciclo celular. Como alternativa, puede obtenerse control más exacto de la expresión del informador usando un promotor específico de fase del ciclo celular conjuntamente con un elemento IRES específico de fase del ciclo celular.

Los elementos IRES adecuados para uso en la invención incluyen: G2-IRES (Cornelis y col., Mol. Cell, (2000), 5 (4), 597-605); IRES de HCV (Honda y col., Gastroenterology, (2000), 118, 152-162); IRES de ODC (Pyronet y col., Mol. Cell, (2000), 5, 607-616); IRES de c-myc (Pyronnet y col., Mol. Cell, (2000), 5(4), 607-616) e IRES de p58 PITSLRE (Cornelis y col., Mol. Cell, (2000), 5(4), 597-605).

La Tabla 1 enumera algunos elementos de control de expresión de preferencia que pueden usarse de acuerdo con la invención, e indica la fase del ciclo celular en la que se activa cada elemento.

TABLA 1

Elementos de Control de Expresión Específicos de Fases del Ciclo Celular

Elemento	Etapas	Elemento	Etapas
Promotor de ciclina B1	G2	Promotor de DHFR	G1 tardío
Promotor de Cdc25B	S/G2	Promotores de histonas	G1/S tardío
Promotor de ciclina A2	S	G2-IRES	G2
Promotor de Cdc2	S	IRES de HCV	M
Promotor de Cdc25C	S	IRES de ODC	G2/M
Promotor de ciclina E	G1 tardío	IRES de c-myc	M
Promotor de Cdc6	G1 tardío	IRES de p53 PITSRE	G2/M

El elemento de control de destrucción es una secuencia de ADN que codifica un motivo de proteína que controla la destrucción de proteínas que contienen esa secuencia. De manera adecuada, el elemento de control de destrucción puede estar mediado por el ciclo celular: caja D de ciclina B1 (Glutzer y col., *Nature*, (1999), 349, 132-138, Yamano y col., *EMBO J.*, (1998), 17(19), 5670-5678, Clute y Pines, *Nature Cell Biology*, (1999), 1, 82-87); extremo N-terminal de ciclina A (den Elzen y Pines, *J. Cell Biol.*, (2001), 153(1), 121-136, Geley y col., *J. Cell Biol.*, (2001), 153, 137-148); caja KEN (Pfleger y Kirschner, *Genes Dev.*, (2000), 14(6), 655-665), Ciclina E (Yeh y col., *Biochem Biophys Res Commun.*, (2001) 281, 884-890), ciclina de Cln2 de *S. cerevisiae* (Berset y col., *Mol. Cell Biol.*, (2002), pág. 4463-4476) y p27Kip (Montagnili y col., *Genes Dev.*, (1999), 13(9), 1181-1189, Nakayama y col., *EMBO J.*, (2000), 19(9), 2069-2081, Tomoda y col., *Nature*, (1999), 398(6723), 160-165).

La Tabla 2 enumera elementos de control de destrucción que pueden usarse según la invención e indica la fase del ciclo celular en la que se activa cada elemento.

Como alternativa, el elemento de control de destrucción puede no estar mediado por el ciclo celular, tales como secuencias PEST como describieron Rogers y col., *Science*, (1986), 234, 364-368. Los ejemplos de elementos de control de destrucción no mediados por el ciclo celular incluyen secuencias derivadas de caseína, ornitina descarboxilasa y proteínas que reducen la semivida de las proteínas. El uso de tales secuencias de control de destrucción no mediadas por el ciclo celular en el procedimiento de la invención proporciona los medios para determinar el tiempo de persistencia del informador del ciclo celular tras la inducción de expresión por un promotor específico del ciclo celular.

TABLA 2

Elementos de Control de Destrucción

Elemento	Etapas
Caja D de ciclina B1	Metafase a través de la fase G1
Extremo N terminal de ciclina A	Prometafase a través de la fase G1
Caja KEN	Anafase/G1
P27Kip1	G1
Ciclina E	Límite G1/S
Cln2	Límite G1/S

De manera adecuada, la molécula informadora de célula viva codificada por la secuencia de ácido nucleico puede seleccionarse del grupo constituido por proteínas fluorescentes y enzimas. Las proteínas fluorescentes adecuadas incluyen la Proteína Fluorescente Verde (GFP) de *Aequorea victoria* y derivados de GFP tales como análogos de GFP funcionales en los que la secuencia de aminoácidos de GFP natural ha sido alterada por delección, adición o sustitución de aminoácidos. Los análogos de GFP adecuados para uso en la presente invención incluyen EGFP (Cormack, B. P. y col., *Gene*, (1996), 173, 33-38); EYFP y ECFP (documento US 6066476, Tsien, R. y col.); F64L-GFP (documen-

to US 6172188, Thastrup, O. y col.); BFP, (documento US 6077707, Tsien, R. y col.). Otras proteínas fluorescentes incluyen DsRed, HcRed y otras proteínas fluorescentes nuevas (BD Clontech y Labas, Y.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci EEUU (2002), 99, 4256-4261) y Renilla GFP (Stratagene). Las enzimas informadoras adecuadas son aquellas que son capaces de generar una señal detectable (por ejemplo fluorescente o luminiscente) en un sustrato para esa enzima.

5 Las enzimas/sustratos particularmente adecuados incluyen: nitrorreductasa/Cy-Q (como está descrita en el documento WO 01/57237) y β -lactamasa/CCF4.

La construcción informadora de ácido nucleico incluye un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular que comprende una secuencia de ADN que codifica un motivo de proteína que es capaz de

10 controlar la localización subcelular de la proteína de una manera específica del ciclo celular. Tal elemento de control de localización es necesario para determinar la localización subcelular del informador para asegurar su funcionamiento y/o destrucción eficaz. Es posible una determinación más exacta de la posición en el ciclo celular usando un elemento de control de localización ya que éste permitirá medir tanto la intensidad como la localización de la señal informadora.

15 Los elementos de control de localización espacial adecuados incluyen aquellos que regulan la localización de una proteína de control del ciclo celular, por ejemplo la ciclina B1 CRS.

El término, unido operativamente indica que los elementos están organizados para funcionar conjuntamente para el objetivo previsto, por ejemplo la transcripción inicia en un promotor y progresa a través de la secuencia de ADN

20 que codifica la proteína fluorescente de la invención. La Figura 2 (2A/2B/2C) ilustra la construcción general de una construcción de ADN según la invención.

En un aspecto de preferencia de la invención, la construcción comprende un promotor de ciclina B1, una caja (caja D) de destrucción de ciclina B1, una secuencia de retención citoplasmática (CRS) de ciclina B1 y una proteína

25 fluorescente verde (GFP).

En un ejemplo particular según la presente invención, la construcción informadora de ácido nucleico comprende un vector de expresión que comprende los siguientes elementos:

30 a) un esqueleto de vector que comprende:

i) un origen de replicación bacteriano; y

35 ii) un gen de resistencia a fármacos bacteriano;

b) un elemento de control de expresión específico de fase del ciclo celular;

c) un elemento de control de destrucción;

40 d) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular; y

e) una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora.

45 Opcionalmente, la construcción informadora de ácido nucleico contiene además un gen eucariota de resistencia a fármacos, de preferencia un gen de resistencia a fármacos de mamífero.

Los vectores de expresión pueden también contener otras secuencias de ácido nucleico, tales como señales de poliadrenilación, señales de empalme de donador/empalme de aceptor, secuencias intervinientes, secuencias potenciadoras

50 de transcripción, secuencias potenciadoras de traducción y similares. Opcionalmente, el gen de resistencia a fármacos y el gen informador pueden estar unidos operativamente por un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES), que es específico de ciclo celular (Sachs, y col., Cell, (2000), 101, 243-245) o independiente del ciclo celular (Jang y col., J. Virology, (1988), 62, 2636-2643 y Pelletier y Sonenberg, Nature, (1988), 334, 320-325), más que los dos genes siendo conducidos por promotores separados. Cuando se usa un elemento IRES no específico del ciclo celular pueden usarse

55 los vector pIRES-neo y pIRES-puro, disponibles comercialmente en Clontech.

En una forma de realización particular del primer aspecto, la construcción informadora de ácido nucleico está montada de una secuencia de ADN que codifica el promotor de ciclina B1 unido operativamente a las secuencias

60 de ADN que codifican 171 aminoácidos del extremo amino terminal de ciclina B1 y de una secuencia de ADN que codifica una proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 3). Los motivos que controlan la localización y la destrucción de ciclina B1 han sido todos mapeados hasta aproximadamente 150 aminoácidos en el extremo amino terminal de la molécula. Por consiguiente, puede construirse un marcador artificial del ciclo celular usando solamente secuencias del extremo amino terminal de ciclina B1, el que no interferirá con la progresión del ciclo celular puesto que carece de una secuencia específica, denominada caja de ciclina, (Nugent y col., J. Cell Sci., (1991), 99, 669-674) que es necesaria

65 para unir y activar una quinasa acompañante. Los motivos reguladores clave necesarios de la secuencia del extremo amino terminal de ciclina B1 son: i) un motivo de nueve aminoácidos denominado caja de destrucción (caja D). Este es necesario para apuntar la ciclina B1 a la maquinaria de ubiquitinación y, conjuntamente con al menos un resto lisina C-terminal, es también necesario para la degradación específica de ciclo celular; ii) una señal de exportación nuclear

de aproximadamente diez aminoácidos (NES). Este motivo es reconocido, directa o indirectamente, por exportina 1 y es suficiente para mantener la carga de ciclina B1 en el citoplasma durante la interfase; iii) aproximadamente cuatro sitios de fosforilación específicos de mitosis que están localizados adyacentes al NES y confieren rápida importación y una exportación nuclear reducida en la mitosis. Cuando está expresada en una célula eucariota, la construcción exhibirá expresión y destrucción específicas de ciclo celular del informador de GFP paralela a la expresión y degradación endógena de la ciclina B1. Por lo tanto, la medida de la intensidad de fluorescencia de GFP permite la identificación de células en la fase G2/M del ciclo celular (Figura 4). Además, puesto que el producto fluorescente de la construcción imitará la localización espacial de la ciclina B1 endógena, el análisis de la distribución subcelular de fluorescencia permite asignar con más precisión la posición dentro del ciclo celular. En la profase, la ciclina B1 rápidamente transloca dentro del núcleo, por consiguiente puede usarse la localización exacta de la fluorescencia de GFP en la célula para discriminar las células en transición desde interfase hacia mitosis. Una vez que una célula alcanza la metafase, y se satisface el punto de control de montaje del huso, la ciclina B1 se degrada muy rápidamente, y por consiguiente puede usarse la desaparición de la fluorescencia de GFP para identificar las células en fase M-media.

La expresión de la construcción en una población de células no sincronizadas dará lugar a que cada célula exhiba expresión y destrucción cíclicas del producto fluorescente de la construcción, dando como resultado un patrón continuo de centelleo de fluorescencia desde todas las células en la población. El análisis de la intensidad de fluorescencia de cada célula con el tiempo da por consiguiente información dinámica sobre el estado del ciclo celular de cada célula como se ilustra en la Figura 4.

Otras formas de realización de la construcción informadora de ácido nucleico según el primer aspecto pueden construirse seleccionando elementos de control alternativos adecuados del ciclo celular, por ejemplo de aquellos mostrados en las Tablas 1 y 2, para diseñar informadores de fases del ciclo celular que informen una sección deseada del ciclo celular.

La construcción y el uso de vectores de expresión y plásmidos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Virtualmente puede usarse cualquier vector de expresión de célula de mamíferos asociado a los marcadores del ciclo celular descritos en este documento. Los ejemplos de esqueletos de vectores adecuados que incluyen genes bacterianos y de mamíferos de resistencia a fármacos y un origen de replicación bacteriano incluyen, pero no se limitan a: pCI-neo (Promega), pcDNA (Invitrogen) y pTriEx1 (Novagen). Los genes bacterianos de resistencia a fármacos adecuados incluyen los genes que codifican las proteínas que confieren resistencia a antibióticos que incluyen, pero no se limitan a: ampicilina, kanamicina, tetraciclina y cloranfenicol. Los marcadores eucariotas de selección de fármacos incluyen agentes tales como neomicina, higromicina, purimicina, zeocina, ácido micofenólico, histidinol, gentamicina y metotrexato.

La construcción de ADN puede prepararse por técnicas convencionales de biología molecular recombinante de restricción, digestión, unión, transformación y purificación de plásmidos por procedimientos familiares para aquellos expertos en la técnica y están descritos en Sambrook, J. y col., (1989), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Como alternativa, puede prepararse la construcción de manera sintética por medio de procedimientos establecidos, por ejemplo el procedimiento de fosforamidita descrito por Beaucage y Caruthers, (Tetrahedron Letters, (1981), 22, 1859-1869) o el procedimiento descrito por Matthes y col. (EMBO J., (1984), 3, 801-805). Según el procedimiento de fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo en un sintetizador automático de ADN, se purifica, hibrida, une y clona en vectores adecuados. La construcción de ADN puede prepararse también por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, como está descrito en el documento US4683202 o como describieron Saiki y col., (Science, (1988), 239, 487-491). Puede encontrarse una revisión de procedimientos de PCR en PCR Protocols, (1990), Academic Press, San Diego, California, EEUU.

Durante la preparación de la construcción de ADN, debe unirse la secuencia del gen que codifica el informador en el marco con el elemento de control de destrucción específico de fase del ciclo celular y el elemento de control de localización espacial. La construcción de ADN resultante puede a continuación colocarse bajo el control de uno o más elementos de control de expresión específicos de fases del ciclo celular.

En un tercer aspecto, se proporciona una célula huésped, que no es una célula embrionaria humana, transfectada con una construcción informadora de ácido nucleico según la presente invención. La célula huésped a la que se le introduce la construcción o el vector de expresión que contiene tal construcción, puede ser cualquier célula de mamífero capaz de expresar la construcción.

La construcción informadora de ADN preparada puede transfectarse dentro de una célula huésped usando técnicas bien conocidas por los expertos. Un enfoque es permeabilizar temporalmente las células usando procedimientos químicos o físicos. Estas técnicas pueden incluir: electroporación (Tur-Kaspa y col., Mol. Cell Biol. (1986), 6, 716-718; Potter y col., Proc. Nat. Acad. Sci. EEUU, (1984), 81, 7161-7165), un procedimiento basado en fosfato de calcio (por ejemplo Graham y Var der Eb, Virology, (1973), 52, 456-467 y Rippe y col., Mol. Cell Biol., (1990), 10, 689-695) o microinyección directa.

Como alternativa, pueden usarse procedimientos basados en lípidos catiónicos (por ejemplo el uso de Superfect (Qiagen) o Eugene6 (Roche)) para introducir ADN dentro de las células (Stewart y col., Human Gene Therapy, (1992), 3, 267; Torchilin y col., FASEB J., (1992), 6, 2716; Zhu y col., Science, (1993), 261, 209-211; Ledley y col., J. Pediatrics, (1987), 110, 1; Nicolau y col., Proc. Nat. Acad. Sci., EEUU, (1983), 80, 1068; Nicolau y Sene, Biochem.

Biophys. Acta, (1982), 721, 185-190), Jiao y col., Biotechnology, (1993), 11, 497-502) describen el uso de protocolos de transferencia de genes mediado por bombardeo para transferir y expresar genes en tejidos cerebrales que pueden usarse también para transferir ADN al interior de células huésped.

5 Otro procedimiento alternativo para transfectar la construcción de ADN dentro de las células usa la capacidad natural de los virus para entrar en las células. Tales procedimientos incluyen vectores y protocolos de transfección basados en, por ejemplo, virus Herpes simplex (Patente de EEUU 5288641), citomegalovirus (Miller, Curr. Top. Microbiol. Immunol., (1992), 158, 1), virus vaccinia (Baichwal y Sudgen, 1986, en Gene Transfer, ed. R. Kucherlapati, Nueva York, Plenum Press, pág. 117-148), y adenovirus y virus adenoasociados (Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol., (1992), 158, 97-129).

Los ejemplos de células huésped recombinantes adecuadas incluyen células HeLa, células Vero, células de ovario de Hámster Chino (CHO), U2OS, COS, BHK, HepG2, NIH 3T3 MDCK, RIN, HEK293 y otras líneas celulares de mamíferos que se cultivan *in vitro*. Tales líneas celulares están disponibles en la American Tissue Culture Collection (ATCC), Bethesda, Maryland, EEUU. En la presente invención también se pretende incluir células, diferentes de células embrionarias humanas, de líneas celulares primarias que se han establecido tras eliminar células de un mamífero seguido por el cultivo de las células durante un período de tiempo limitado.

Pueden usarse también líneas celulares que exhiben expresión estable de un informador de posición en el ciclo celular para establecer xenoinjertos o células generadas por ingeniería genética en animales huésped usando procedimientos convencionales. (Krasagakis, K. J. y col., Cell Physiol., (2001), 187 (3), 386-391; Paris, S. y col., Clin. Exp. Metastasis, (1999), 17(10), 817-822). Los xenoinjertos de líneas celulares tumorales generadas para expresar informadores de posición en el ciclo celular permitirán establecer sistemas modelo para estudiar la división, estasis y metástasis de células tumorales y seleccionar nuevos fármacos anticáncer.

El uso de líneas celulares generadas por ingeniería genética o tejidos transgénicos que expresan un informador de posición en el ciclo celular como aloinjertos en un animal huésped permitirá estudiar los mecanismos que afectan la tolerancia o el rechazo de transplantes de tejidos (Pye D. y Watt, D. J., J. Anat., (2001), 198 (Pt2), 163-173; Brod, S. A., y col., Transplantation (2000), 69(10), 2162-2166).

Para llevar a cabo el procedimiento para determinar la posición en el ciclo celular de una célula según el segundo aspecto, pueden cultivarse células transfectadas con la construcción informadora de ADN bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de una molécula informadora en una etapa específica del ciclo celular. Típicamente, la expresión de la molécula informadora se producirá entre 16 y 72 horas post transfección, pero puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo. Si la molécula informadora está basada en una secuencia de proteína fluorescente verde, el informador puede tomar un tiempo definido para plegarse en una conformación que es fluorescente. Este tiempo depende de la secuencia primaria del derivado de la proteína fluorescente verde usado. La proteína informadora fluorescente puede también cambiar de color con el tiempo (véase por ejemplo, Tersikh, Science, (2000), 290, 1585-1588) en cuyo caso es necesaria el análisis de imágenes en intervalos de tiempo especificados tras la transfección.

La posición en el ciclo celular de las células puede determinarse controlando la expresión de la molécula informadora y detectando señales emitidas por un informador usando un dispositivo de detección adecuado. Si la molécula informadora produce una señal fluorescente, puede usarse entonces un microscopio de fluorescencia convencional, o un microscopio de fluorescencia confocal. Si la molécula informadora produce luminiscencia, puede usarse entonces un dispositivo adecuado tal como un luminómetro. Usando estas técnicas, puede determinarse la proporción de células que expresan la molécula informadora. Si la construcción de ADN contiene elementos de control de translocación y las células se examinan usando un microscopio, puede también determinarse la localización del informador. En el procedimiento según la presente invención, puede medirse adecuadamente la fluorescencia de células transformadas o transfectadas con la construcción de ADN por medios ópticos en por ejemplo; un espectrofotómetro, un fluorímetro, un microscopio de fluorescencia, un dispositivo de imágenes de carga acoplada enfriado (CCD) (tal como un escáner generador de imágenes o un sensor de área de imágenes), un seleccionador de células activadas por fluorescencia, un microscopio confocal o un dispositivo de exploración confocal, en los que pueden determinarse las propiedades de las células en cultivo como exploraciones de excitación y emisión de luz.

En la forma de realización de la invención en la que la construcción informadora de ácido nucleico comprende un gen de resistencia a fármacos, tras la transfección y expresión del gen de resistencia a fármacos (usualmente 1-2 días), pueden seleccionarse las células que expresan el gen informador modificado cultivando las células en presencia de un antibiótico para el que las células transfectadas son resistentes debido a la presencia de un gen marcador seleccionable. La finalidad de añadir el antibiótico es seleccionar células que expresan el gen informador y que tienen, en algunos casos, integrado el gen informador, con su promotor asociado, elementos IRES, secuencias potenciadoras y de terminación en el genoma de la línea celular. Tras la selección, puede aislarse una línea celular clónica que expresa la construcción usando técnicas convencionales. Posteriormente puede cultivarse la línea celular clónica bajo condiciones convencionales y expresará la molécula informadora y producirá una señal detectable en un punto específico del ciclo celular.

Las células transfectadas con la construcción informadora de ácido nucleico según la presente invención pueden crecer en ausencia y/o en presencia de un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona,

ES 2 290 326 T3

proteína o péptido a estudiar y cuyo efecto sobre el ciclo celular de una célula quiere determinarse. Determinando la proporción de células que expresan la molécula informadora y, opcionalmente, la localización de la señal dentro de la célula, es posible determinar el efecto del compuesto de prueba en el ciclo celular de las células, por ejemplo, si el compuesto de prueba detiene a las células en una etapa particular del ciclo celular, o si el efecto es la aceleración o deceleración de la división celular.

Por consiguiente, en un cuarto aspecto, se proporciona un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido sobre la posición en el ciclo celular de una célula de mamífero, que comprende:

a) expresar en una célula en ausencia y en presencia de dicho compuesto de prueba una construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida operativamente a y bajo el control de:

i) al menos un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular;

b) determinar la posición dentro del ciclo celular controlando las señales emitidas por la molécula informadora en el que una diferencia entre las señales emitidas medidas en ausencia y en presencia de dicho compuesto de prueba es indicativa del efecto de dicho compuesto de prueba sobre la posición en el ciclo celular de dicha célula.

En un quinto aspecto, se proporciona un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido sobre la posición en el ciclo celular de una célula de mamífero, que comprende:

a) expresar en la célula en ausencia y en presencia del compuesto de prueba una construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida operativamente a y bajo el control de:

i) al menos un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular;

b) determinar la posición dentro del ciclo celular controlando las señales emitidas por la molécula informadora,

c) comparar la señal emitida en presencia del compuesto de prueba con un valor conocido para la señal emitida en ausencia del compuesto de prueba;

en el que una diferencia entre la señal emitida medida en presencia del compuesto de prueba y el valor conocido en ausencia del compuesto de prueba es indicativa del efecto del compuesto de prueba sobre la posición en el ciclo celular de dicha célula.

En un sexto aspecto, se proporciona un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido sobre la posición en el ciclo celular de una célula de mamífero, que comprende:

a) proporcionar células que contienen una construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida de manera operativa a y bajo el control de:

i) al menos un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular;

b) cultivar la primera y segunda población de las células respectivamente en presencia y en ausencia del compuesto de prueba y bajo condiciones que permitan la expresión de la construcción informadora de ácido nucleico; y

c) medir las señales emitidas por la molécula informadora en la primera y en la segunda población;

en el que una diferencia entre las señales emitidas medidas en la primera y la segunda población es indicativa del efecto del compuesto de prueba sobre la posición en el ciclo celular de la célula.

El término compuesto de prueba pretende significar un agente tal como un fármaco, hormona, proteína, péptido, ácido nucleico y similar, al que está expuesto la célula. Como alternativa, el compuesto de prueba puede ser un agente tal como un ácido nucleico, péptido o proteína expresado en la célula bajo estudio. Por ejemplo, las células transfectadas con las construcciones informadoras de ácido nucleico según la presente invención pueden usarse para determinar si la expresión de ADNc que contiene construcciones que codifican proteínas bajo estudio tienen un efecto sobre la posición en el ciclo celular de una célula. Una serie de ADNc, insertada en un vector de expresión de mamífero, puede transfectarse transitoriamente en una célula que expresa de manera estable el informador de posición en el ciclo celular. Controlando la expresión y localización de la construcción informadora de ácido nucleico en estas células transfectadas, es posible determinar los efectos de las proteínas codificadas por los ADNc en el ciclo celular.

Las construcciones informadoras de posición en el ciclo celular de ácido nucleico según la presente invención pueden usarse también en un procedimiento para determinar el efecto de la posición en el ciclo celular sobre un proceso celular, o para determinar el efecto de la posición en el ciclo celular en la acción de una sustancia de prueba sobre un proceso celular. Es bien sabido que muchos procesos celulares, incluyendo aquellos que responden a estímulos externos, están influenciados por el ciclo celular de forma que funcionan o responden de manera diferente en diferentes etapas del ciclo celular. Por ejemplo, se ha mostrado que los receptores de endotelina se expresan en diferentes niveles durante diferentes fases del ciclo celular (Okazawa y col., J. Biol. Chem., (1998), 273, 12584-12592) y por consiguiente la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por endotelina varía con la posición en el ciclo celular. De manera similar, las respuestas celulares de movilización de Ca^{2+} a la vasopresina difieren según la posición en el ciclo celular (Abel y col., J. Biol. Chem., (2000), 275, 32543.32551) debido a variaciones en la ruta de transducción de señales que usa diferentes proteínas G en diferentes fases del ciclo celular. El uso de construcciones informadoras de posición en el ciclo celular permitirá medir variaciones de célula a célula en ensayos biológicos usando un informador de ensayo adecuado, para correlacionar con la señal de un informador de posición en el ciclo celular para determinar si alguna variación en la señal del ensayo correlaciona con la señal del informador de posición en el ciclo celular y por lo tanto determinar cualquier dependencia del ciclo celular en la señal del ensayo. Por ejemplo, pueden idearse ensayos en los que la cantidad de un ligando marcada con fluorescencia roja unido a un receptor de la superficie celular esté correlacionada con el estado del ciclo celular determinado usando un informador GFP de posición en el ciclo celular. Por proceso celular, se entiende los procesos normales que sufren las células vivas e incluye: biosíntesis, captación, transporte, unión a receptores, metabolismo, fusión, respuesta bioquímica, crecimiento y muerte.

Pueden usarse dos o más construcciones de ácido nucleico informadoras de posición en el ciclo celular en combinación en aplicaciones que incluyen informar sobre la transición a través de dos o más fases del ciclo celular dentro de la misma célula. Para lograr tal informe doble o múltiple, se producen dos o más construcciones diferentes y se expresan en la misma célula, en la que cada construcción informadora comprende una combinación diferente de elementos de control unidos a un informador distinguible y diferente. Por ejemplo, la expresión celular de una construcción que comprende un promotor de ciclina B1 y caja D de ciclina B1 unido de manera operativa a GFP en combinación con la expresión en la misma célula de una segunda construcción que comprende un promotor de ciclina A2 y caja D de ciclina B1 unido de manera operativa a proteína fluorescente azul (BFP) permitirá discriminar células en fase S (fluorescencia azul) de células en fase G2/M (fluorescencia azul y verde).

Las construcciones informadoras de posición en el ciclo celular y los procedimientos de ensayo según la presente invención pueden usarse en una diversidad de aplicaciones adicionales, por ejemplo:

i) Las células transfectadas con las construcciones informadoras de posición en el ciclo celular de la presente invención pueden usarse para determinar el efecto del ciclo celular en la expresión, translocación o distribución subcelular de un segundo marcador en un ensayo múltiple. Por ejemplo, si se está estudiando la translocación intracelular de un informador fluorescente hacia la membrana plasmática y se encuentra que un compuesto de prueba da como resultado la translocación en un porcentaje de células, entonces, usando células transfectadas con una construcción según la invención, es posible determinar si la translocación fue dependiente del ciclo celular.

Por consiguiente, en un séptimo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto del ciclo celular de mamífero sobre la expresión, translocación o distribución subcelular de un primer informador detectable conocido por variar en respuesta a un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido, que comprende:

a) expresar en la célula en presencia de un compuesto de prueba una segunda construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida de manera operativa a y bajo el control de:

i) un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular; en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular;

b) determinar la posición en el ciclo celular controlando las señales emitidas por la segunda molécula informadora;

c) controlar las señales emitidas por el primer informador detectable,

en el que la relación entre la posición en el ciclo celular determinada en la etapa b) y la señal emitida por el primer informador detectable es indicativa de si la expresión, translocación o distribución subcelular del primer informador detectable es o no es dependiente del ciclo celular. El término “compuesto de prueba” debe entenderse como se describió anteriormente en este documento en relación con el cuarto, quinto y sexto aspecto de la presente invención.

ii) Los informadores de posición en el ciclo celular de la presente invención pueden usarse en combinación con análisis de marcadores o fenómenos celulares endógenos relacionados con el ciclo celular, para obtener más información sobre el estado del ciclo celular de una célula individual o población de células. Por ejemplo, es bien sabido que el complejo de Golgi tiene una morfología distintiva en células de mamífero, comprendiendo una estructura similar a una cinta adyacente al núcleo, y que se producen cambios distintivos en la estructura del Golgi a medida que la célula sufre mitosis ya que la estructura de cinta se convierte en grupos de vesículas y túbulos dispersados por toda la célula mitótica. (Lowe y col., Trends Cell Biol., (1998), 8(1) 40-44). El análisis de la morfología de los componentes celulares, tales como el aparato de Golgi, que varía de una manera conocida con la progresión del ciclo celular, por ejemplo por medio del uso de tinciones fluorescentes específicas, puede usarse en combinación con un informador de posición en el ciclo celular para permitir el análisis con más detalle de la progresión del ciclo celular.

iii) Los informadores de posición en el ciclo celular según la presente invención pueden usarse también para controlar el estado y la progresión del ciclo celular en aplicaciones *in vivo*. Por ejemplo, la introducción de una construcción de ADN que codifica un informador del ciclo celular en especímenes vivos tales como oocitos de *Xenopus*, y organismos vivos tales como *C. elegans* y *Drosophila*, vía transfección de células individuales o células múltiples puede lograrse por microinyección (Krone P. H., y Heikkila J. J., Development, (1989), 106(2), 271-281), inyección balística (Horard B. y col., Insect Mol. Biol., (1994), 3(4), 61-65, y otros procedimientos bien conocidos por los expertos. La introducción de construcciones informadoras del ciclo celular en tales especímenes permitirá la investigación de la progresión y control del ciclo celular en la progenie celular de las células transfectadas. Probablemente la información de los informadores sea de valor significativo en el estudio del crecimiento y desarrollo en organismos modelo.

iv) Los informadores de la presente invención pueden usarse en la generación de organismos transgénicos, es decir, donde el ADN que codifica el informador de posición en el ciclo celular está expresado de manera estable en todas las células de un organismo o animal. Tales organismos transgénicos pueden generarse por microinyección de ADN en embriones tempranos, generalmente en uno de los pronúcleos de un huevo recién fertilizado. (Bishop J. O., Reprod. Nutr. Dev., (1996), 36(6), 607-618). Pueden usarse técnicas transgénicas para incorporar informadores de posición en el ciclo celular en una variedad de especies huésped a partir de organismos simples tales como *C. elegans* (Daniells, C. y col., Mutat. Res., (1998), 399(1), 55-64) a organismos más complejos tales como ratones y ratas (Sills, R. C., y col., Toxicol. Lett., (2001), 20(1-3), 187-198). El establecimiento de expresión transgénica estable de un informador de posición en el ciclo celular en todas las células de un organismo transgénico permitirá determinar el estado del ciclo celular en cualquier tipo de célula dentro, o aislada, del organismo, incluyendo líneas celulares cultivadas derivadas del organismo. Por consiguiente, en un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un organismo transgénico no humano que comprende una célula como se describió anteriormente.

Breve descripción de la invención

La invención se ilustra además por referencia a los siguientes ejemplos y figuras en las que:

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra la regulación de ciclina B1 durante la progresión del ciclo celular. El ciclo celular avanza en la dirección de la flecha con la expresión de ciclina B1 dirigida por un promotor específico de fase del ciclo celular que inicia la expresión al final de la fase S y tiene un pico durante G2 (A). Al comienzo de la mitosis (B) la ciclina B1 transloca desde el citoplasma hacia el núcleo y desde metafase en adelante (C) la proteína se degrada específicamente.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra las construcciones de ácido nucleico informadoras de posición en el ciclo celular según la presente invención y en las que, 2ª usa un promotor específico de fase del ciclo celular y ningún elemento IRES, 2B usa un elemento IRES para facilitar la selección de mamífero, y 2C contiene un promotor constitutivo o inducible de mamífero y un IRES específico de fase del ciclo celular como elemento de control de

la expresión. En cada caso A representa un control de expresión específico de fase del ciclo celular (promotor), B representa un elemento de control de destrucción específico de fase del ciclo celular, C representa un elemento de control de localización específico de fase del ciclo celular, D representa un gen informador, E representa un elemento IRES no específico de ciclo celular, F representa un marcador seleccionable de mamífero, G representa un promotor constitutivo de mamífero y H representa un elemento IRES específico de ciclo celular.

La Figura 3 muestra una construcción de ADN para determinar la fase G2/M del ciclo celular, que contiene un promotor de ciclina B1 (A), caja de destrucción de ciclina B1 (caja D) (B), CRS de ciclina B1 (C) y un informador de GFP (D).

La Figura 4 ilustra la expresión de una construcción de ácido nucleico que expresa el marcador de fase G2/M del ciclo celular en una población de células no sincronizadas. Cada célula exhibe expresión y destrucción cíclicas del producto fluorescente de la construcción, dando como resultado un patrón de “centelleo” de fluorescencia desde todas las células en la población. El análisis de la intensidad de fluorescencia de cada célula en los tiempos 1, 2, 3 y 4 da información dinámica del estado de posición celular de cada célula.

La Figura 5 es un diagrama de barras que muestra el efecto de los agentes que bloquean el ciclo sobre la fluorescencia de GFP a partir de un marcador de fase del ciclo celular según la invención. A representa células inhibidas en mitosis por demecolchicina, B representa células de control y C representa células inhibidas en fase G1/S por mimosina;

La Figura 6 es una serie de fotografías de lapsos de tiempo que muestran una célula a la que se le inyectó la construcción descrita en el Ejemplo 1 y sufriendo mitosis según el Ejemplo 3.

La Figura 7 es una serie de fotografías de lapsos de tiempo que muestran una célula U2-OS que expresa la construcción descrita en el Ejemplo 1 sufriendo mitosis según el Ejemplo 4. En el panel A sobre la izquierda está en fase G2 del ciclo celular, en el panel B ha entrado en profase, en el panel C la célula está en metafase, en el panel D la célula está en telofase y en el panel E las dos células hijas no son fluorescentes y están en fase G1.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la fluorescencia relativa de una célula U2-OS y su progenie que expresan de manera estable la construcción descrita en el Ejemplo 1 según el Ejemplo 4. La célula sufre mitosis (B) en 34 horas dividiéndose en dos nietas (1.1 y 1.2) y la Hija 2 sufre mitosis en 42 horas (C) dividiéndose en nietas (2.1 y 2.2). Las flechas en negrita muestran el aumento en la fluorescencia de las células hijas durante la fase G2 y previo a la mitosis.

La Figura 9 es un análisis FACS de una línea celular U2-OS que expresa de manera estable una construcción que contiene eGFP según el Ejemplo 5. El gráfico superior muestra un histograma de tinción con yoduro de propidio con FL3A (fluorescencia roja) trazada en el eje X frente a número de células con esa fluorescencia en el eje Y. Este gráfico ilustra que la proporción de células en G1, S y G2/M son como se esperaban. El gráfico inferior es un trazado de puntos de las mismas células mostrando FL3A (roja) en el eje X y FL1H (fluorescencia verde) en el eje Y. El patrón diagonal (en cajas) indica que las células en G2/M tienen más fluorescencia verde que las células en fase S que a su vez tienen más fluorescencia que las células en fase G1.

La Figura 10 es un análisis FACS que muestra el efecto de inhibidores del ciclo celular sobre la intensidad de fluorescencia verde relativa de la línea celular estable descrita en el Ejemplo 5 según el Ejemplo 6. Como en la Figura 9 los histogramas (a la izquierda) muestran el número de células (eje Y) frente a FL3A y los trazos de puntos (a la derecha) muestran las mismas células trazadas con FL1H (eje Y) frente a FL3A (eje X). Los dos gráficos superiores muestran células de control que no han sido tratadas con un inhibidor del ciclo celular. Como puede verse estas células muestran el típico perfil de ciclo celular (A) y tienen patrón diagonal que indica que las células con más GFP están en la parte G2/M del ciclo celular. Los dos gráficos del medio muestran células que han sido bloqueadas en G2/M con colchicina (C). La mayoría de estas células tienen una fluorescencia verde relativamente alta (D). Los dos gráficos inferiores muestran células que han sido parcialmente bloqueadas en G1/S por mimosina (E). La mayoría de estas células tienen una fluorescencia verde relativamente baja (F).

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

1. Preparación de la construcción de ADN

i) Se amplificó el tercio N terminal del ARNm de ciclina B1 (aminoácidos 1-171), que codifica la caja de destrucción de ciclina B1 y la NES con extremos HindIII y BamHI usando técnicas convencionales de PCR y los siguientes cebadores:

```
GGGAAGCTTAGGATGGCGCTCCGAGAGTCACCAGGAAC
GCCGGATCCCACATATTCCTAGAAAGGTT.
```

ii) Se amplificó el gen para wtGFP con cebadores diseñados para introducir sitios de restricción que facilitarán la construcción de proteínas de fusión. Se clonó el producto de PCR en pTARGET (Promega) según las instrucciones

del fabricante y se introdujeron mutaciones (F64L/S175G/E222G) usando el equipo de mutagénesis dirigido a sitios QuikChange (Stratagene). Se verificaron las construcciones por medio de secuenciación de ADN. A continuación se clonó el ADN que codifica la GFP mutante secuencia debajo de la región N terminal de ciclina B1 usando sitios de restricción de BamHI y SalI.

iii) Se amplificó la región dependiente del ciclo celular del promotor de ciclina B1 (-150 -> +182) con sitios SalII y HindIII y se clonó secuencia arriba de la región N terminal de ciclina B1 y la proteína de fusión de GFP.

iv) Se escindió el promotor y el ADN que codifica la proteína recombinante y se clonó en lugar del promotor de CMV en un corte de BglII/NheI de vector derivado de pCI-Neo.

2. Efecto de agentes bloqueadores del ciclo celular sobre la fluorescencia de GFP de marcador de fase del ciclo celular usando células transfectadas transitoriamente

Se cultivaron células U2-OS (ATCC HTB-96) en pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos. Se transfectaron las células con una construcción informadora del ciclo celular preparada según el Ejemplo 1, que comprende un promotor de ciclina B1 unido de manera operativa a las secuencias que codifican la caja D de ciclina B1, la CRS de ciclina B1, y GFP en un vector pCORON4004 (Amersham Biosciences) usando Eugene 6 (Roche) como el agente de transfección.

Tras 24 horas de cultivo, se expusieron las células a bloqueadores específicos del ciclo celular mimosina (bloquea en el límite de las fases G1/S) o demecolcina (bloquea en fase M). Se expusieron las células de control al medio de cultivo solo.

Se incubaron células durante otras 24 horas y a continuación se analizó la expresión de GFP usando un escáner de imágenes confocal con análisis automatizado de imágenes (IN Cell Analysis System, Amersham Biosciences).

Como se muestra en la Figura 5, las células expuestas a demecolcina mostraron aumento de fluorescencia en comparación con células control mientras que las células expuestas a mimosina mostraron disminución de fluorescencia en comparación con las células control. Estos resultados son coherentes con el uso propuesto del informador de fases del ciclo celular de la invención. Las células bloqueadas en fase G1/S (tratadas con mimosina), previo al tiempo de activación del promotor de ciclina B1, muestran fluorescencia disminuida, mientras que las células bloqueadas en fase M (tratadas con demecolcina), previo al tiempo de acción de la caja D de ciclina B1, muestran fluorescencia aumentada.

Estos resultados indican que los informadores de fases del ciclo celular de la presente invención son adecuados para detectar agentes que modulan la progresión del ciclo celular en un sistema transitorio y además tales informadores permiten la identificación de la fase del ciclo celular en la que están bloqueadas las células.

3. Microinyección y Fotografía de lapsos de tiempo de la construcción

Se microinyectaron células HeLa con la construcción preparada según el Ejemplo 1 y se examinaron por microscopía en lapsos de tiempo, como se muestra en la Figura 6. A la izquierda se muestran imágenes de contraste de interferencia diferencial (DIC) con la imagen de fluorescencia correspondiente a la derecha. El marco A muestra una célula (con flecha) en metafase que muestra fluorescencia brillante en el núcleo. Los marcos B y C muestran la misma célula en tiempos posteriores en anafase (B) y anafase tardía (C). Las imágenes DIC de B y C muestran la división de la célula en dos células hijas (indicadas por 2 flechas), las imágenes de fluorescencia correspondientes muestran la pérdida de fluorescencia que acompaña la destrucción de la construcción fluorescente a medida que progresa el ciclo celular.

4. Producción de líneas celulares estables y fotografía de lapsos de tiempo

Se transfectaron células U2-OS (ATCC HTB-96) con la construcción descrita en el Ejemplo 1 y se cultivaron durante varios meses en medio de cultivo que contenía 1 mg/ml de geneticina para seleccionar células con expresión estable de la construcción. Se tomó un número de clones por medio de procedimientos convencionales (por ejemplo descritos en Freshney, Capítulo 11 en Culture of Animal Cells, (1994) Wiley-Liss Inc.) y se aisló un clon que contenía células fluorescentes. Se mantuvo la línea celular a 37°C en medio de cultivo que contenía HEPES 25 mM y se tomó una imagen de fluorescencia de las células cada 15 minutos durante un período de 24 horas usando una lámpara convencional de xenón a 488 nm. La Figura 7 muestra 5 marcos de una porción de la imagen que indica que la línea celular se comporta como se esperaba. Las células en G2 exhiben fluorescencia verde en el citoplasma, las células en mitosis temprana tienen fluorescencia predominantemente en el núcleo y tras la mitosis se degrada el gen del informador y las células pierden su fluorescencia.

La Figura 8 muestra el destino de una célula del mismo clon que se controló durante 48 horas y que sufrió dos divisiones celulares para producir cuatro células nietas. Para cada punto temporal se midió la intensidad promedio de cada una de las progenies de las células y se trazó un gráfico frente al tiempo. Como puede verse la célula original entra en mitosis a las -4 horas, una de las hijas se divide a las 32 horas y la otra a las 42 horas en el experimento. A medida que las células dejan la fase S y entran en G2 hay un aumento estable en la intensidad promedio hasta que la célula entra en mitosis cuando la célula vuelve al ciclo y la intensidad promedio aumenta dramáticamente.

5. Preparación de una línea celular estable más brillante y posterior análisis FACS

Se reemplazó la secuencia del informador de proteína fluorescente verde en el vector descrito en el Ejemplo 1 con GFP potenciada (EGFP; Cormack, B. P. y col., Gene, (1996), 173, 33-38; BD Clontech) por medio de procedimientos convencionales. El gen de EGFP es una forma más brillante de GFP que contiene las mutaciones F64L y S65T. Además, EGFP contiene codones que han sido alterados para optimizar la expresión en células de mamífero. Se transfectó esta nueva construcción en células U2-OS y se aislaron un número de colonias por selección con genética seguida por la selección de células únicas usando selección de células activadas por fluorescencia. Estos clones mostraron fluorescencia más brillante que aquellos generados en el Ejemplo 4 y como se esperaba, la intensidad de fluorescencia y localización pareció variar según la fase del ciclo celular de la célula.

Se prepararon las células para análisis FACS por medio de procedimientos convencionales. Brevemente, se fijaron las células y se permeabilizaron usando CytoFix/CytoPerm (Becton Dickinson) según los procedimientos de los fabricantes. A continuación se trataron las células con 50 µg/ml de ARNasa y Triton X-100 al 0,4% y se sometieron a contratinción con 100 µg/ml de yoduro de propidio. El grado de tinción de yoduro de propidio es proporcional a la cantidad de ADN en la célula y por consiguiente es una medida de la fase del ciclo celular de la célula. Como puede verse en la Figura 9, como se esperaba, el grado de tinción de yoduro de propidio rojo y la cantidad de fluorescencia verde de GFP parece ser proporcional en las células.

6. El efecto de fármacos que inhiben el ciclo celular sobre la expresión de GFP

Se cultivaron las células preparadas en el Ejemplo 5 en matraces de 25 cm³ tratados con demecolcina 100 ng/ml (Sigma) o mimosina 1 mM (Sigma) durante 24 horas. A continuación se fijaron las células, se permeabilizaron y tñeron con yoduro de propidio como se describió en el Ejemplo 5. El análisis FACS reveló que, como se esperaba, las células tratadas con el análogo de colchicina se detuvieron en G2/M y las células tratadas con mimosina se detuvieron en el límite de G1/S. Como también se esperaba, las células que se detuvieron en G2/M fueron más brillantes que las células detenidas en G1/S (Figura 10).

REIVINDICACIONES

1. Una construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida de manera operativa a y bajo el control de:
 - i) al menos un elemento de control de expresión específico de fase del ciclo celular,
 - ii) un elemento de control de destrucción, y
 - iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular.
2. Una construcción según la reivindicación 1, en la que dicho elemento de control de expresión controla la transcripción de una manera específica del ciclo celular.
3. Una construcción según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el elemento de control de expresión controla la traducción de una manera específica del ciclo celular.
4. Una construcción según las reivindicaciones 1-3, en la que el elemento de control de expresión se selecciona de un promotor específico del ciclo celular y un IRES específico del ciclo celular.
5. Una construcción según la reivindicación 4, en la que dicho promotor se selecciona del grupo constituido por promotor de ciclina B1, promotor de Cdc25B, promotor de ciclina A2, promotor de Cdc2, promotor de Cdc25C, promotor de ciclina E, promotor de Cdc6, promotor de DHFR y promotores de histonas.
6. Una construcción según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que dicho IRES se selecciona del grupo constituido por G2-IRES, IRES de HCV, IRES de ODC, IRES de c-myc e IRES de p58 PITSLRE.
7. Una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho elemento de control de destrucción se selecciona del grupo constituido por caja D de ciclina B1, extremo N terminal de ciclina A, caja KEN, ciclina E y p27Kip1.
8. Una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular es la secuencia de retención citoplasmática (CRS) de ciclina B1 incluyendo su NES.
9. Una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicha molécula informadora de célula viva se selecciona del grupo constituido por proteína fluorescente y enzima.
10. Una construcción según la reivindicación 9, en la que dicha proteína fluorescente se selecciona de Proteína Fluorescente Verde (GFP) y un análogo funcional de GFP en el que la secuencia de aminoácidos de GFP natural ha sido alterada por delección, adición o sustitución de aminoácidos.
11. Una construcción según la reivindicación 9, en la que dicho informador de enzima se selecciona del grupo constituido por una β -lactamasa y nitrorreductasa.
12. Una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende un promotor de ciclina B1, una caja de destrucción (caja D) de ciclina B1, una secuencia de retención citoplasmática (CRS) de ciclina B1 y una proteína fluorescente verde (GFP).
13. Una construcción informadora de ácido nucleico que comprende un vector de expresión que comprende:
 - a) un esqueleto de vector que comprende:
 - i) un origen de replicación bacteriano; y
 - ii) un gen de resistencia a fármacos bacteriano;
 - b) un elemento de control de expresión específico de fase del ciclo celular;
 - c) un elemento de control de destrucción;
 - d) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular; y
 - e) una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora.
14. Una construcción según la reivindicación 13 que además contiene un gen eucariota de resistencia a fármacos.

ES 2 290 326 T3

15. Una célula huésped, que no es una célula embrionaria humana, transfectada con una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Un procedimiento *in vitro* para determinar la posición en el ciclo celular de una célula de mamífero, que comprende:

a) expresar en una célula una construcción informadora de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14; y

b) determinar la posición en el ciclo celular controlando señales emitidas por la molécula informadora.

17. Un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido sobre la posición en el ciclo celular de una célula de mamífero, que comprende:

a) expresar en dicha célula en ausencia y en presencia de dicho compuesto de prueba una construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida de manera operativa a y bajo el control de:

i) un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular; y

b) determinar la posición dentro del ciclo celular controlando las señales emitidas por la molécula informadora, en el que una diferencia entre las señales emitidas medidas en ausencia y en presencia de dicho compuesto de prueba es indicativa del efecto de dicho compuesto de prueba sobre la posición en el ciclo celular de dicha célula.

18. Un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido sobre la posición en el ciclo celular de una célula de mamífero, que comprende:

a) expresar en dicha célula en presencia de dicho compuesto de prueba una construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida de manera operativa a y bajo el control de:

i) un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular; y

b) determinar la posición en el ciclo celular controlando las señales emitidas por la molécula informadora,

c) comparar la señal emitida en presencia del compuesto de prueba con un valor conocido para la señal emitida en ausencia del compuesto de prueba;

en el que una diferencia entre la señal emitida medida en presencia del compuesto de prueba y dicho valor conocido en ausencia del compuesto de prueba es indicativa del efecto de dicho compuesto de prueba sobre la posición en el ciclo celular de dicha célula.

19. Un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto de un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido sobre la posición en el ciclo celular de una célula de mamífero, que comprende:

a) proporcionar células que contienen una construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida de manera operativa a y bajo el control de:

i) un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ES 2 290 326 T3

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular;

b) cultivar la primera y segunda población de dichas células respectivamente en presencia y en ausencia del compuesto de prueba y bajo condiciones que permitan la expresión de la construcción informadora de ácido nucleico; y

c) medir las señales emitidas por la molécula informadora en la primera y en la segunda población;

en el que una diferencia entre las señales emitidas medidas en dicha primera y segunda poblaciones es indicativa del efecto del compuesto de prueba sobre la posición en el ciclo celular de dicha célula.

20. Un procedimiento *in vitro* para determinar el efecto del ciclo celular de mamífero sobre la expresión, translocación o distribución subcelular de un primer informador detectable que se sabe que varía en respuesta a un compuesto de prueba constituido por un fármaco, ácido nucleico, hormona, proteína o péptido, que comprende:

a) expresar en dicha célula en presencia de un compuesto de prueba una segunda construcción informadora de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula informadora de célula viva detectable unida de manera operativa a y bajo el control de:

i) un elemento de control de la expresión específico de fase del ciclo celular,

ii) un elemento de control de destrucción, y

iii) un elemento de control de localización espacial específico de fase del ciclo celular;

en el que dicha construcción informadora se expresa en una célula en un punto predeterminado en el ciclo celular;

b) determinar la posición en el ciclo celular controlando las señales emitidas por la segunda molécula informadora; y

c) controlar las señales emitidas por el primer informador detectable,

en el que la relación entre la posición en el ciclo celular determinada en la etapa b) y la señal emitida por el primer informador detectable es indicativa de si la expresión, translocación o distribución subcelular del primer informador detectable es o no es dependiente del ciclo celular.

21. El procedimiento *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que dicha construcción informadora de ácido nucleico comprende la construcción de la reivindicación 12.

22. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que dicho compuesto de prueba es un agente seleccionado de un péptido o proteína que se expresa en la célula bajo estudio.

23. Un organismo transgénico no humano que comprende una célula según la reivindicación 15.

Figura 1

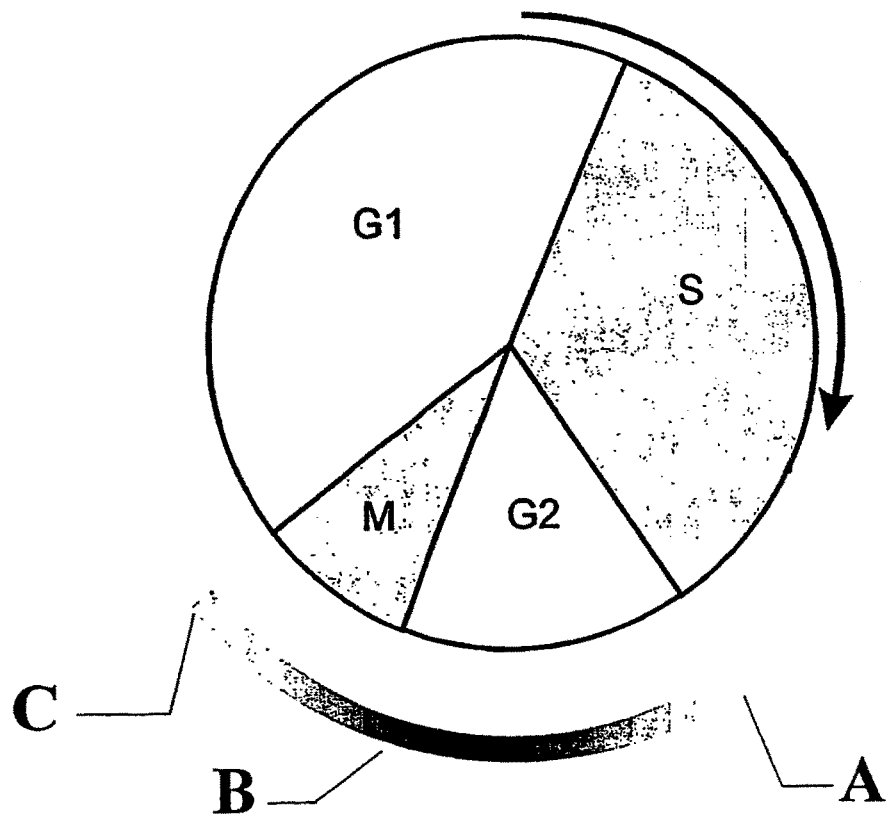


Figura 2

2A



2B



2C



Figura 3



Figura 4

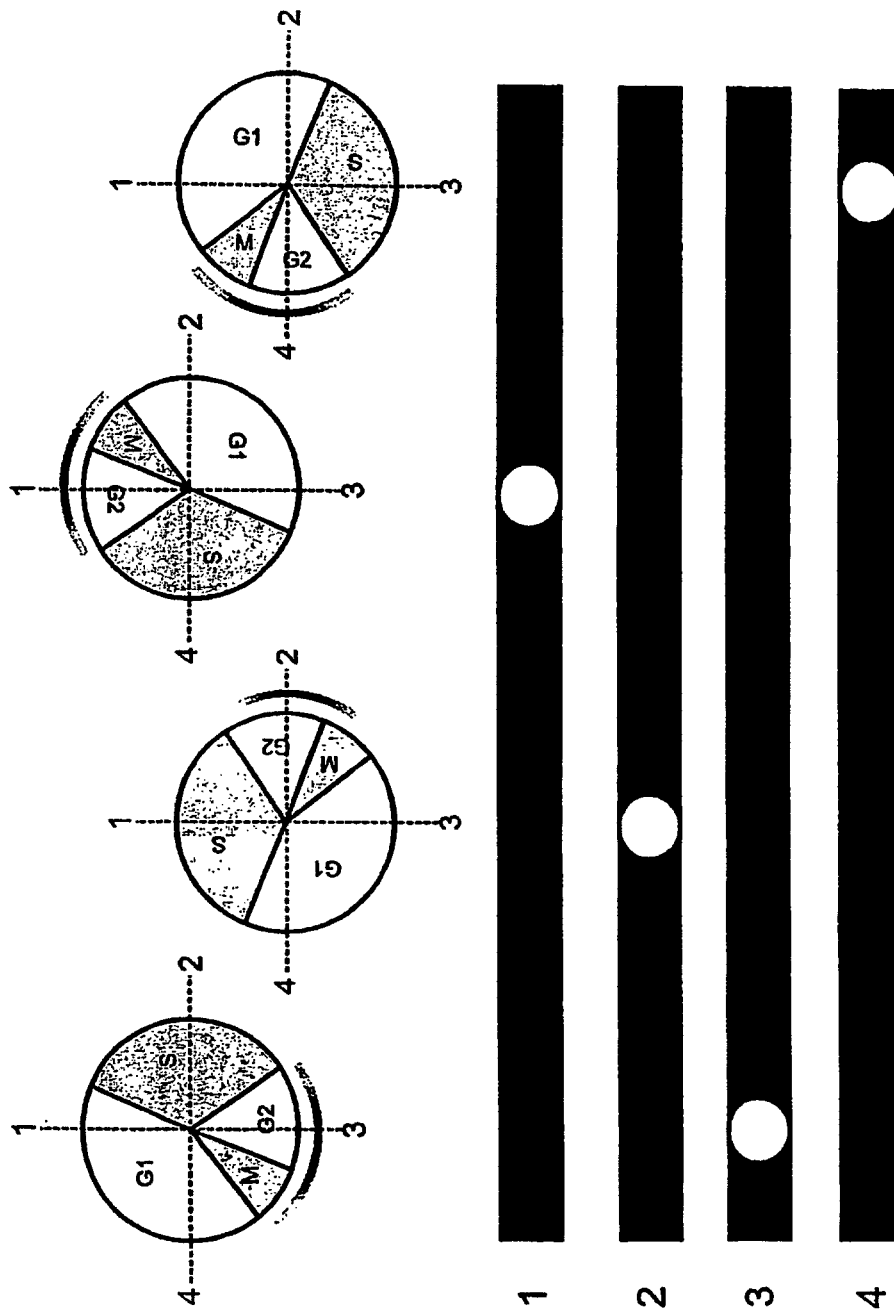


Figura 5

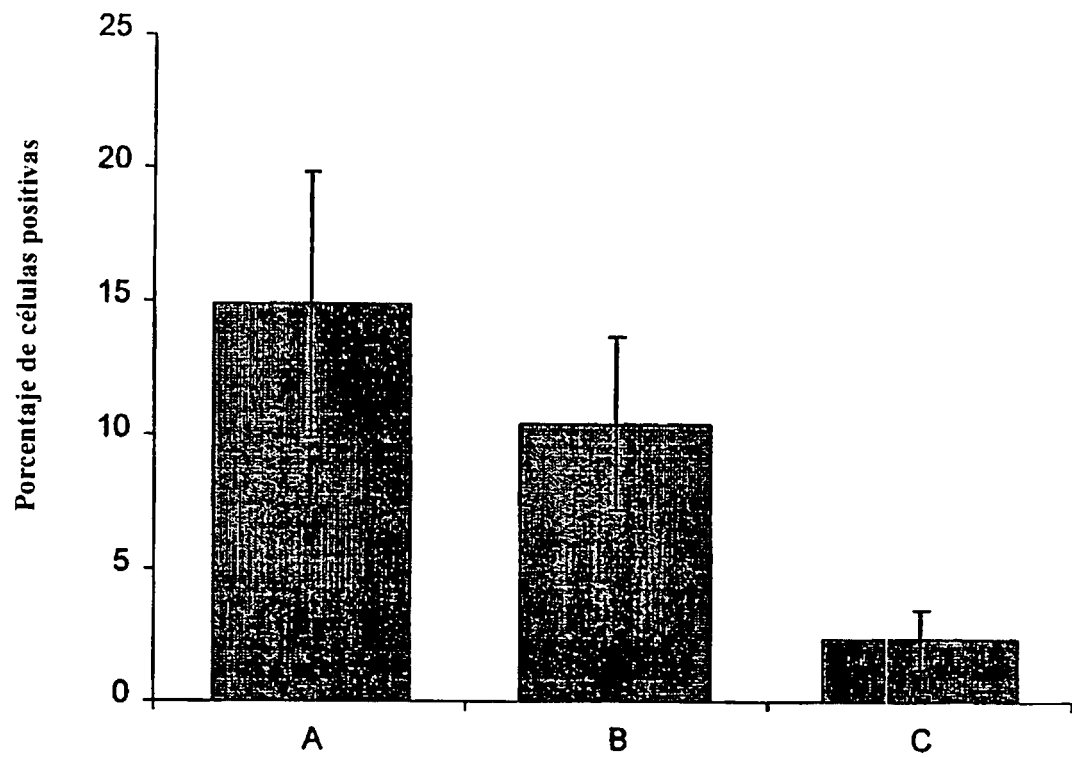


Figura 6

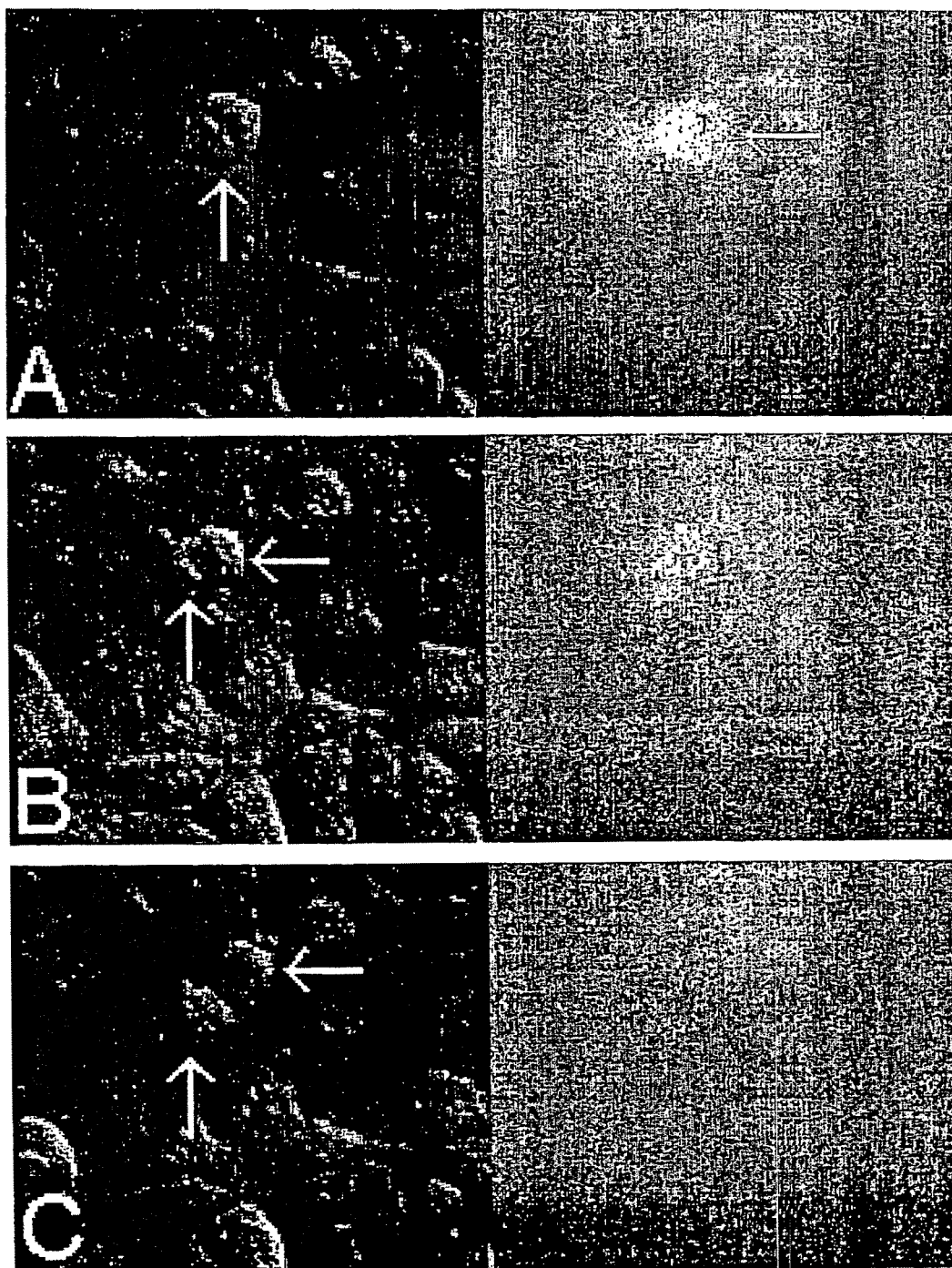
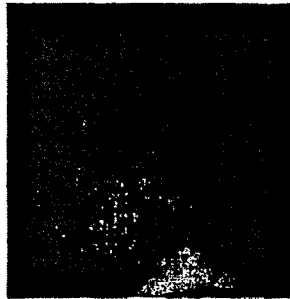
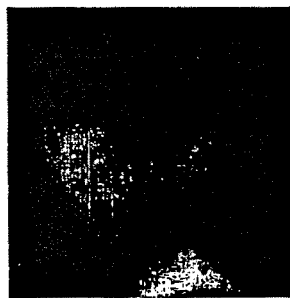


Figura 7



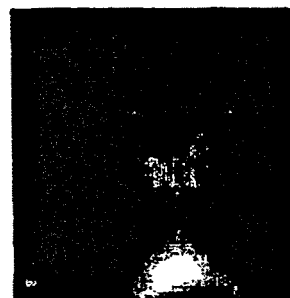
A



B



C



D



E

Figura 8

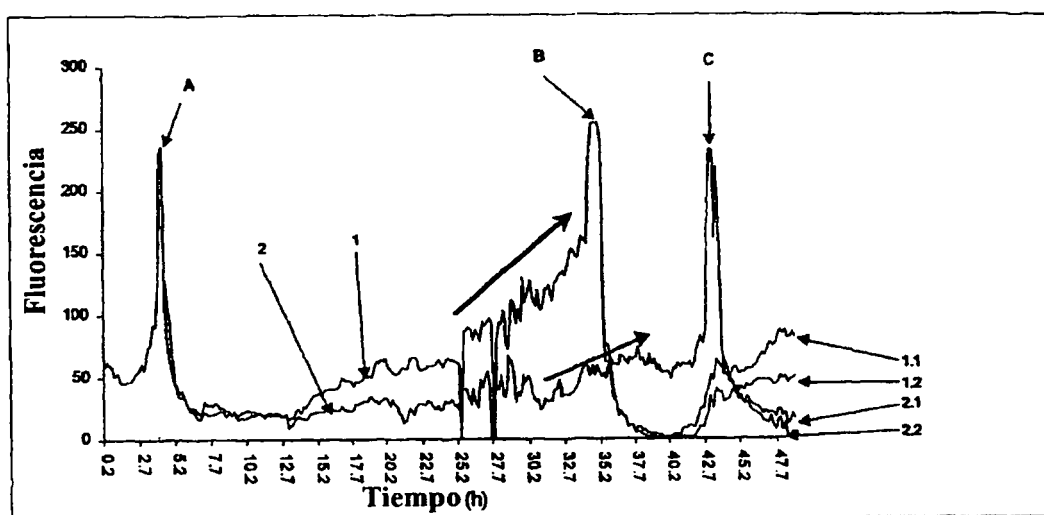


Figura 9

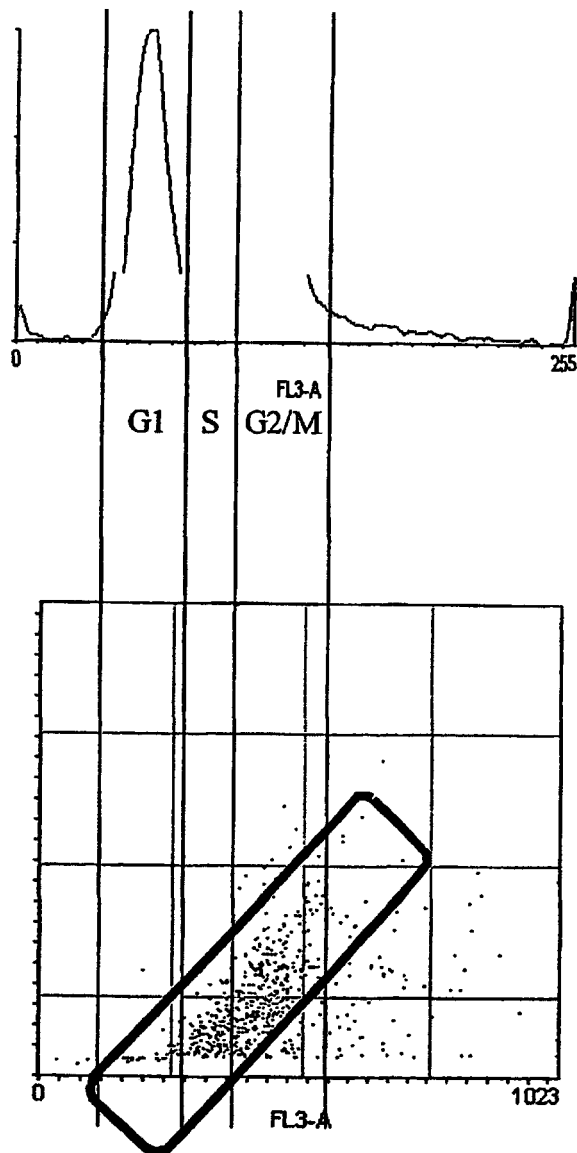
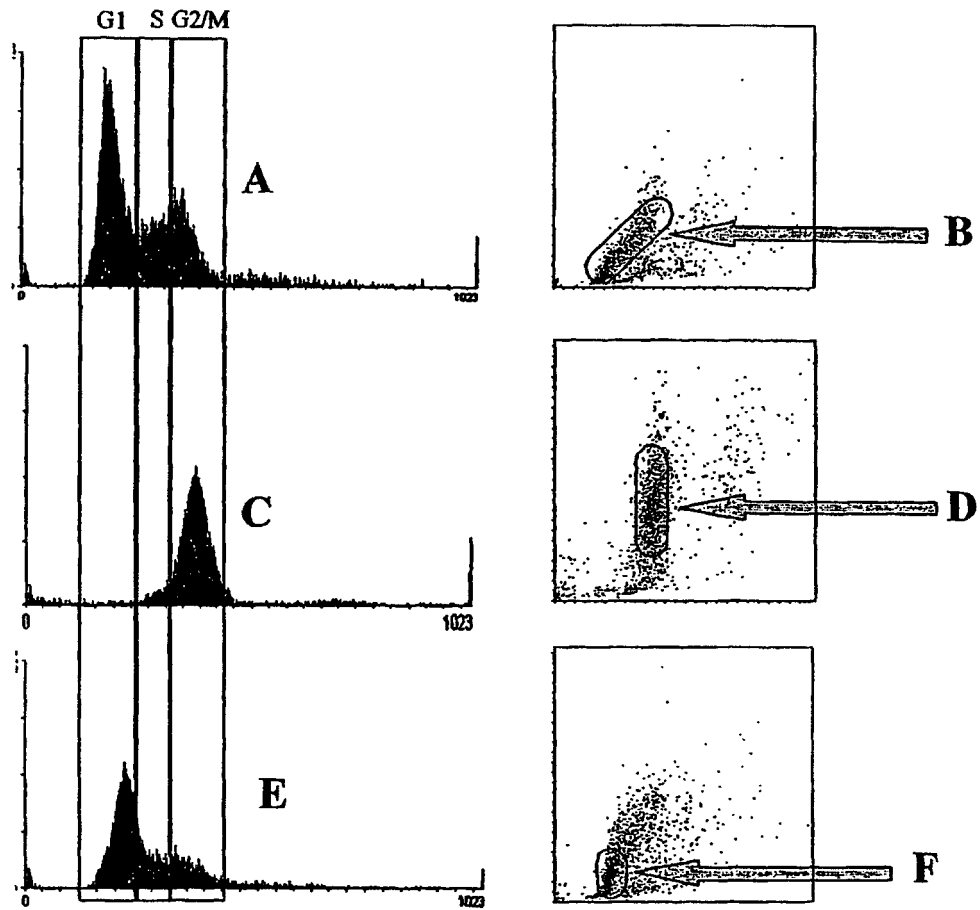


Figura 10



ES 2 290 326 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Amersham Biosciences UK Ltd	
5	<120> Procedimiento para Determinar la Posición en el ciclo Celular	
	<130> PL0161	
	<140> PCT/GB02/04258	
	<141> 12-09-2002	
10	<160> 2	
	<170> PatentIn version 3.1	
	<210> 1	
	<211> 36	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 1	
25	gggaagctta ggatggcgct ccgagtcacc aggaac	36
	<210> 2	
	<211> 30	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
35	<400> 2	
40	gccggatccc acatattcac tacaaggtt	30
45		
50		
55		
60		
65		