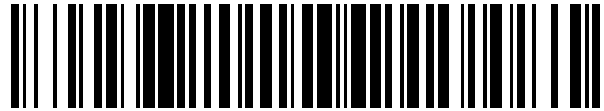


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 603**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010 E 10730775 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2451841**

54 Título: **Detección y visualización del ciclo celular en células vivas**

30 Prioridad:

06.07.2009 EP 09008827

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

10.02.2015

73 Titular/es:

**LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT (100.0%)
Geschwister-Scholl-Platz 1
80539 München, DE**

72 Inventor/es:

**ROTHBAUER, ULRICH;
LEONHARDT, HEINRICH;
ZOLGHADR, KOUROSH;
ROMER, TINA y
SCHMIDTHALS, KATRIN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 528 603 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

Detección y visualización del ciclo celular en células vivas

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une específicamente al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos que se desvía de la SEC ID NO: 2 por sustitución conservadora de uno o más aminoácidos en la posición 1 a 28, 38 a 52, 63 a 98 y 115 a 123 de la SEC ID NO: 2. La presente invención también se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención, a una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención y a un procedimiento de detección de la cantidad y/o ubicación del PCNA en células vivas, así como a un procedimiento de detección selectiva de compuestos que tienen un efecto sobre el ciclo celular.

Los anticuerpos son herramientas valiosas para identificar y visualizar estructuras celulares. Sin embargo, la aplicación de anticuerpos de origen natural para la detección de antígenos intracelulares requiere la permeabilización (y a menudo la fijación) de las células. Además, la detección basada en anticuerpos de antígenos dentro de células *intactas* se evita esencialmente por el hecho de que los anticuerpos están, por naturaleza, diseñados para funcionar en un entorno oxidante (extracelular): la reducción del ambiente en el citoplasma conduce a una alteración de la formación de puentes disulfuro, que da lugar a un ensamblaje ineficiente de las partes que reconocen el epítipo de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada (Biocca et al. (1990); Cattaneo et al. (1999). Únicamente en unos pocos casos, los anticuerpos intracelulares (AclC) se han utilizado para afectar a la función de las proteínas *in vivo*, pero aún se sabe poco sobre sus propiedades en las células vivas (Biocca et al. (1993); Biocca et al. (1990); Marasco et al. (1998); Cardinale et al. (1998); Kontermann (2004).

En un intento por evitar los problemas asociados con la aplicación de anticuerpos en el citoplasma de células intactas, en el pasado se ha estudiado la expresión proteica mediante la fusión de proteínas de interés a proteínas fluorescentes tales como GFP ("marcaje con GFP"). El marcaje de proteínas con proteínas fluorescentes se ha convertido en un procedimiento extremadamente popular para estudiar el tráfico intracelular de proteínas y en combinación con técnicas de fotoblanqueo con fluorescencia, ha proporcionado información única sobre la dinámica de las proteínas en células vivas. No obstante, solo se puede medir la dinámica de las proteínas quiméricas, mientras que las proteínas auténticas, sus modificaciones postraduccionales así como los componentes no proteínicos de la célula no se pueden evaluar mediante los procedimientos disponibles. Adicionalmente, la mayoría de estos enfoques dan como resultado la agregación de la proteína de fusión en la célula, es decir en una ubicación y/o expresión que no corresponde a la ubicación y/o expresión naturales de la proteína (Chalfie y Kain, 2005; Leonhardt et al., 1998).

En los últimos tiempos, la exploración del ciclo celular y los procesos que intervienen en el mismo ha ganado cada vez más interés. Además de la detección visual de las diferentes fases del ciclo celular usando microscopía óptica, procedimientos aplicados habitualmente para estudiar el ciclo celular comprenden la tinción de los cromosomas que implica la fijación de las células y la tinción del núcleo con colorantes fluorescentes tales como DAPI que no es útil para rastrear proteínas específicas implicadas en el ciclo celular.

Para superar estas limitaciones, sería deseable generar aglutinantes proteicos detectables que eviten los problemas y limitaciones de los anticuerpos de origen natural y establecer su aplicación en la célula viva preferentemente evitando la interferencia con los procesos celulares. Estos aglutinantes serían preferentemente útiles para rastrear las diferentes etapas del ciclo celular y proteínas específicas.

De acuerdo con ello, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une específicamente al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos que se desvía de la SEC ID N.^o por sustitución conservadora de uno o más aminoácidos en la posición 1 a 28, 38 a 52, 63 a 98 y 115 a 123 de la SEC ID NO: 2. Ejemplos de tales polipéptidos que comprenden sustituciones conservadoras de uno o más aminoácidos en una o dos regiones marco están representados por las SEC ID N.^{os}: 16 y 18.

La expresión "molécula de ácido nucleico" tal como se usa indistintamente con el término "polinucleótido", de acuerdo con la presente invención, incluye ADN, tal como ADNc o ADN genómico y ARN tal como ARNm. Se incluyen además moléculas que imitan al ácido nucleico conocidas en la técnica tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos siempre y cuando se puedan introducir y expresar en una célula. Las moléculas de ácido nucleico pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas adicionales, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica.

La expresión "que se une de forma específica", de acuerdo con la presente invención se refiere a la propiedad de los polipéptidos de la invención de tener una afinidad por proteínas específicas, es decir, proteínas diana, que es mayor por un factor de al menos 10, preferentemente de al menos 100, más preferentemente de al menos 1.000 y lo más preferentemente de al menos 10.000 en comparación con la afinidad por proteínas no relacionadas con la proteína

diana. La proteína diana del polipéptido de la presente invención es PCNA.

La expresión "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de uno o más aminoácidos por otro aminoácido con propiedades físicas y químicas tales como el tamaño y la carga similares. La expresión es bien conocida en la técnica y en el presente documento se usa con el mismo significado. Ejemplos de sustituciones conservadoras son la sustitución de valina por leucina, de cisteína por serina, de glutamina con asparagina o de ácido aspártico por ácido glutámico o viceversa. En relación con la presente invención, las sustituciones conservadoras no alteran o esencialmente no alteran las propiedades del polipéptido de la invención tales como sus propiedades de unión y/o su comportamiento dentro de las células eucariotas. En el ejemplo de la actividad de unión al PCNA, el término "esencialmente" denota una actividad de unión de al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 % y lo más preferentemente al menos el 95 % en comparación con la del polipéptido de la invención que no comprende sustituciones de aminoácidos. En el ejemplo del comportamiento del polipéptido dentro de las células eucariotas, el término "esencialmente" denota por ejemplo, una expresión y/o distribución dentro de la célula que es comparable a la del polipéptido de la invención que no comprende sustituciones de aminoácidos.

Los aminoácidos desde la posición 1 a 28, 38 a 52, 63 a 98 y 115 a 123 de la SEC ID NO: 2 forman la región marco del polipéptido de la invención. En los ejemplos, se han determinado las regiones marco así como las regiones CDR que están implicadas en la unión del PCNA (véase la Figura 1). Además de no interferir con la unión del polipéptido de la invención a PCNA, las sustituciones de aminoácidos se deben elegir de tal manera que no interfieran con el plegamiento correcto del polipéptido y que no alteren la estructura tridimensional del marco de modo que la unión al PCNA ya no sea posible.

A partir de la información divulgada en la presente solicitud y de su conocimiento común, el experto sabe qué aminoácidos se pueden sustituir y también conoce procedimientos para comparar las propiedades de un polipéptido que comprende una o más sustituciones de aminoácidos con los del polipéptido de la invención que no comprende ninguna sustitución de aminoácidos. Procedimientos ejemplares comprenden estudios de solubilidad, ensayos de formación de agregados, análisis de distribución, ensayos de unión y estudios de expresión en células eucariotas vivas.

Ejemplos del ácido nucleico de la invención que codifica un polipéptido con una o más sustituciones conservadoras en una o dos regiones marco son los de las SEC ID N.^{os}: 15 y 17 que codifican los polipéptidos de las SEC ID N.^{os}: 16 y 18 (véase la figura 9).

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que un polipéptido de unión a PCNA se puede aplicar en las células vivas para la detección de la presencia y/o localización del PCNA en dichas células. El polipéptido de la invención deriva de anticuerpos de camélido, cuyas producción recombinante general y cuyo procedimiento de selección se conocen bien en la técnica (por ejemplo, mediante expresión en fagos y técnicas recombinantes, véanse, por ejemplo, Hoogenboom et al. (1998); Pluckthun (1994); Verma et al. (1998)) y comprende el dominio VHH de la cadena pesada de los anticuerpos de camélido. Como es evidente a partir de los ejemplos adjuntos, solo uno de los ocho polipéptidos de unión a PCNA obtenidos usando expresión en fagos y/o el ensayo de F2H divulgado en el documento PCT/EP2009/000067 fue capaz de proporcionar las propiedades ventajosas necesarias para su aplicación en las células vivas.

Los anticuerpos que se unen específicamente a PCNA se conocen en la técnica (Rottach et al., 2008). Sin embargo, hasta ahora no ha sido posible generar anticuerpos que permitan la detección de PCNA en células vivas sin una pérdida fatal de la función de dichos anticuerpos. Además, los procedimientos alternativos usados hasta ahora dependen de una fusión de un polipéptido fluorescente con el PCNA y de la introducción de esta proteína de fusión en las células. Este procedimiento tiene algunos inconvenientes importantes. Entre otras cosas, la sobreexpresión de la proteína de fusión produce agregados no deseados e inespecíficos que no corresponden a la cantidad o localización del PCNA no fusionado a un polipéptido fluorescente. Por tanto, la presente invención no solo supera el inconveniente de este procedimiento sino que también proporciona por primera vez medios para la detección de PCNA en células vivas sin interferir en el recambio normal de PCNA en las células o en la función de PCNA como una plataforma de carga esencial para las enzimas implicadas en la replicación del ADN (Bravo R. et al., 1987).

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en (a) la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID N.^{os}: 1, 15 o 17; o (b) una secuencia de ácido nucleico degenerado con respecto a la secuencia de ácido nucleico de (a).

El término "degenerado" de acuerdo con la presente invención se refiere a la degeneración del código genético. Un código de tripletes de bases designa 20 aminoácidos y un codón de terminación. Dado que existen cuatro bases que se utilizan para codificar la información genética, se requieren codones de tripletes para producir por lo menos 21 códigos diferentes. Las 4³ posibilidades para bases en tripletes dan 64 codones posibles, lo que significa que debe existir alguna degeneración. Como resultado, algunos aminoácidos están codificados por más de un triplete, es decir por hasta seis. La degeneración surge principalmente por alteraciones en la tercera posición en un triplete. Esto significa que las moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia diferente a la especificada anteriormente, pero que todavía codifica el mismo polipéptido entran dentro del alcance de la presente invención.

En otra realización preferida la molécula de ácido nucleico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador peptídico o proteínico detectable visualmente.

La expresión "visualmente detectable" se refiere a una propiedad física o química de un marcador que permite su detección usando medios visuales. Típicamente, los marcadores detectables visualmente se pueden detectar ya que emiten radiación tal como fluorescencia, luminiscencia, fosforescencia o radiactividad.

En esta realización, el ácido nucleico de la invención codifica un polipéptido que comprende un polipéptido que se une específicamente al PCNA de acuerdo con la invención (un primer componente polipeptídico), un marcador peptídico o proteínico visualmente detectable (un segundo polipéptido o componente peptídico) tal como un polipéptido fluorescente y un enlazador. Un polipéptido de esta estructura, en relación con la presente invención, también se denomina "proteína de fusión". En otras palabras, una proteína de fusión de acuerdo con la invención comprende dos componentes polipeptídicos o un polipéptido y un componente peptídico o proteínico y un enlazador.

En una realización más preferida dicho marcador peptídico o proteínico detectable visualmente es un polipéptido fluorescente, en el que dicho polipéptido fluorescente se separa de dicho polipéptido que se une específicamente a PCNA por un enlazador de al menos un residuo de aminoácido.

El término "polipéptido" como se usa en el presente documento de forma intercambiable con el término "proteína" describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, que contienen más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos de acuerdo con la invención, en particular las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido fluorescente, preferentemente no forman oligómeros. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados de forma natural, en los que la modificación se efectúa mediante por ejemplo glucosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que son bien conocidas en la técnica.

La expresión "polipéptido fluorescente" o "proteína fluorescente" se refiere a polipéptidos que emiten luz fluorescente tras la excitación a una longitud de onda específica. En la presente invención se pueden usar diversas proteínas fluorescentes. Un grupo de tales proteínas fluorescentes incluye la proteína fluorescente verde aislada de *Aequorea victoria* (GFP), así como una serie de variantes de la GFP, tales como la proteína fluorescente cian, la proteína fluorescente azul, la proteína fluorescente amarilla, etc (Zhang et al., 2002; Zimmer, 2002). Típicamente, estas variantes o los ácidos nucleicos que las codifican comparten una identidad de secuencia de aproximadamente el 80 %, o mayor con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 o la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO: 3, respectivamente. Los mutantes de GFP con desplazamiento de color emiten en color azul a verde amarillento, brillo y fotoestabilidad incrementados (Tsien, 1998). Uno de tales mutantes de GFP, denominado la proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP) (Tsien, 1998), muestra una emisión máxima a 529 nm. Una YFP puede tener por ejemplo la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8 o estar codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 7. También se han descrito otras variantes basadas en la GFP que tienen espectros de emisión y excitación modificados (Tsien et al., solicitud de patente de EE.UU. 200201231 13A1), intensidad de fluorescencia y tolerancia térmica potenciada (Thastrup et al., solicitud de patente de EE.UU. 20020107362A1; Bjorn et al., solicitud de patente de EE.UU. 20020177189A1) y formación de cromóforos a niveles de oxígeno reducidos (Fisher, patente de EE.UU. N.º. 6.414.119).

Otro grupo de proteínas fluorescentes incluye las proteínas fluorescentes aisladas de antozoos, incluyendo sin limitaciones la proteína roja fluorescente aislada de especies de *Discosoma* de coral, DsRed (Matz et al., 1999) (véase, por ejemplo, el número de acceso AF168419). DsRed y las otras proteínas fluorescentes de antozoos comparten únicamente una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 26-30 % con la GFP salvaje de *Aequorea victoria*, aunque todos los motivos cruciales se conservan, lo que indica la formación de la estructura en barril beta de 11 cadenas característica de la GFP. La estructura cristalina de DsRed también se ha resuelto y muestra conservación de la estructura en barril beta de 11 cadenas de la GFP (Id de MMDB: 5742).

También se ha descrito una serie de mutantes de la proteína roja fluorescente DsRed de mayor longitud de onda y de forma similar, se puede usar en la generación de las proteínas de fusión de la invención que comprenden poli(péptidos) fluorescentes. Por ejemplo, los mutantes de DsRed descritos recientemente con espectros de emisión desplazados más allá hacia el rojo se pueden usar en la práctica de la invención (Baird et al., 2000; Terskikh et al., 2000; Wiehler et al., 2001).

Las versiones monoméricas de DsRed son, por ejemplo, mRFP, mCherry (por ejemplo, que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 6 o están codificados por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 5), mRFP1 (Campbell et al., 2002), mOrange o mPlum (Shaner et al., 2004) o TagRFP (Merzlyak et al., 2007).

Más recientemente se han descrito GFP de los antozoos *Renilla reniformis* y *Renilla kollikeri* (Ward et al., solicitud de patente de EE.UU. 20030013849), que también se pueden usar de acuerdo con la invención.

Recientemente se ha descrito un número cada vez mayor de otras proteínas fluorescentes de una serie de formas marinas y actualmente, en el Banco de Datos de proteínas se enumera una serie de estructuras cristalinas de GFP y de mutantes de GFP, así como las estructuras cristalinas de varios análogos de GFP. Se han descrito proteínas fluorescentes relacionadas con estructuras que se han deducido que son similares a las GFP de corales, plumas

marinas, tunicados y anémonas marinas y se pueden usar en la generación de las proteínas de fusión de la invención (véanse revisiones en Zhang et al., 2002; Zimmer, 2002).

También se han comunicado proteínas fluorescentes de *Anemonia majano*, *Zoanthus sp.*, *Discosoma striata*, *Discosoma sp.* y *Clavularia sp.* (Matz et al., 1999). Se ha comunicado que una proteína fluorescente clonada de las especies de coral duro, *Trachyphyllia geoffroyi*, emite luz verde, amarilla y roja y que convierte la emisión de luz verde en luz roja tras la exposición a luz UV (Ando et al., 2002). Las proteínas fluorescentes descritas recientemente en anémonas marinas incluyen proteínas fluorescentes verde y naranja clonadas a partir de *Anemonia sulcata* (Wiedenmann et al., 2000), una proteína verde fluorescente potenciada de forma natural clonada a partir de los tentáculos de *Heteractis magnifica* (Tu et al., 2003), una proteína roja fluorescente no oligomerizante basada en la cromoproteína hcrCP de *Hereractis crispera* (Gurskaya et al., 2001; Fradkov et al., 2002), una cromoproteína morada generalmente no fluorescente que muestra una débil fluorescencia roja clonada en *Anemonia sulcata* y un mutante de la misma que muestra espectros de emisión con desplazamiento al rojo lejano (595 nm) (Lukyanov et al., 2000).

Adicionalmente, se ha descrito otra clase de proteínas relacionadas con la GFP que tienen propiedades cromofóricas y fluorescentes. Uno de estos grupos de proteínas derivadas de corales, las pocilloporinas, exhiben un amplio rango de características de espectros y fluorescentes (Dove y Hoegh-Guldberg, 1999, solicitud de PCT WO 00146233; Dove et al., 2001). Recientemente, se ha descrito la purificación y cristalización de la pocilloporina Rtms5 del coral generador de arrecifes *Montipora efflorescens* (Beddoe et al., 2003). La Rtms5 tiene un color azul oscuro y es débilmente fluorescente. No obstante, se ha notificado que la Rtms5, así como otras cromoproteínas con homología de secuencia con Rtms5, se pueden interconvertir en una proteína fluorescente en el rojo lejano a través de sustituciones de un solo aminoácido (Beddoe et al., 2003; Butina et al., 2002; Lukyanov et al., 2000).

También se conocen otras diversas cromoproteínas derivadas del coral estrechamente relacionadas con las pocilloporinas (véase, por ejemplo, Gurskaya et al., 2001; Lukyanov et al., 2000). Otros ejemplos de proteínas fluorescentes son GFP de *Renilla reniformis*, mKO de *Fungia concinna*, verde Azami de *Galaxeidae* o cOFP de *Cerianthus*.

Kredel et al. (2009) describen la proteína fluorescente mRuby que se deriva de *Entacmaea quadricolor*. Un ejemplo de una proteína fluorescente derivada de bacterias se describe en Shu et al. (2009).

Una revisión de proteínas fluorescentes conocidas se puede encontrar en Shaner et al., 2007.

Cualquier proteína fluorescente o cromofórica o fragmento fluorescente o cromofórico de la misma se puede usar de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

El término “enlazador” hace referencia a la relación entre los componentes polipeptídicos, o el polipéptido y los componentes peptídicos o proteináceos de la proteína de fusión de la invención. Un enlazador de acuerdo con la presente invención está compuesto por aminoácidos que comprenden al menos un residuo de aminoácidos que está localizado entre los componentes polipeptídicos mencionados, o el polipéptido y los componentes peptídicos o proteináceos de la proteína de fusión. Un enlazador tal puede ser en algunos casos, útil para, por ejemplo, mejorar el plegamiento por separado de los componentes polipeptídicos individuales de la proteína de fusión de la invención o para modular la estabilidad de la proteína de fusión. Adicionalmente, tales residuos enlazadores pueden contener señales para transporte, secuencias de reconocimiento de la proteasa o señales para modificación secundaria. El enlazador puede ser tan corto como de 1 residuo de aminoácido o de hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 residuos. En casos concretos, el enlazador puede implicar incluso hasta 100 o 150 residuos. Se prefiere que el enlazador comprenda entre 18 y 30 aminoácidos, más preferentemente entre 20 y 25 aminoácidos y lo más preferentemente, entre 22 y 24 aminoácidos, tal como 23 aminoácidos.

Enlazadores particularmente preferidos comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.^{os}: 13 o 14.

En una realización más preferida, el polipéptido fluorescente es GFP, RFP o YFP, preferentemente codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.^{os}: 3, 5 o 7 o que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.^{os}: 4, 6 u 8, o un mutante fluorescente o fragmento del mismo.

Un “mutante fluorescente” de acuerdo con la presente invención indica cualquier proteína fluorescente, preferentemente derivada de las secuencias GFP, RFP o YFP anteriores. Los mutantes fluorescentes tienen preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, lo más preferentemente de al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 % con dicha GFP, RFP o YFP, al tiempo que conserva o conserva esencialmente sus propiedades fluorescentes.

Un “fragmento fluorescente” de acuerdo con la invención se refiere a partes o fragmentos de las anteriores GFP, RFP o YFP o mutantes fluorescentes de las mismas que son más cortos de secuencia pero que todavía conservan o conservan esencialmente sus propiedades fluorescentes.

En relación con la presente invención, la expresión “conservan esencialmente” se refiere a las propiedades

- fluorescentes de los mutantes fluorescentes o fragmentos fluorescentes de acuerdo con la invención. A este respecto, las propiedades fluorescentes esenciales en el contexto de la presente invención, aunque en principio también se refieren a los espectros de absorción o de emisión, se refieren al brillo de un mutante fluorescente o fragmento fluorescente en comparación con el polipéptido fluorescente del que deriva. De acuerdo con ello, la expresión “conserva esencialmente” significa que el mutante fluorescente o fragmento fluorescente tiene al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, todavía más preferentemente al menos el 90 %, lo más preferentemente al menos el 95 % del brillo del polipéptido fluorescente del que deriva.
- En otra realización más preferida, el polipéptido que se une específicamente al PCNA se localiza en el extremo N de dicho polipéptido fluorescente.
- Mientras que el polipéptido que se une específicamente al PCNA puede en principio también estar localizado en el extremo C de dicho polipéptido fluorescente, los ejemplos adjuntos se han llevado a cabo con el polipéptido que se une específicamente al PCNA localizado en el extremo N del polipéptido fluorescente. La funcionalidad de esta disposición se ha demostrado.
- En una realización preferida adicional la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID N.^{os}: 9, 11, 19 o 21 o codifica una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las SEC ID N.^{os}: 10, 12, 20 o 22.
- Como es evidente por los ejemplos adjuntos, el polipéptido de la invención que se une específicamente a PCNA, cuando está fusionado a GFP o RFP, no solo ejerce la actividad de unión deseada al PCNA sino que también se puede expresar intracelularmente sin interferir en los procesos celulares que implican al PCNA. Esto permite una detección fiable de la presencia y/o localización del PCNA en la célula viva.
- En un aspecto diferente, la presente invención se refiere a un vector (de expresión) que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.
- Preferentemente, el vector es un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado convencionalmente en ingeniería genética.
- La molécula ácido nucleico de la presente invención se puede insertar en varios vectores disponibles comercialmente. Ejemplos no limitantes incluyen vectores plasmídicos procarióticos tales como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión (Novagen) o pCRTOPO (Invitrogen), lambda gt11, pJOE, la serie pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 y vectores compatibles con la expresión en células eucarióticas, tales como levaduras o células de mamífero, como pREP (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pIZD35, el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL), pGEMHE (Promega), pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Ejemplos de vectores plasmídicos adecuados para la levadura *Pichia pastoris* comprenden, por ejemplo, los plásmidos pA0815, pPIC9K y pPIC3.5K (todos de Invitrogen).
- La molécula ácido nucleico de la presente invención a la que se ha hecho referencia anteriormente también puede insertarse en vectores de modo que se genera una fusión traduccional (adicional) con otra molécula ácido nucleico. La otra molécula ácido nucleico puede codificar una proteína que puede, por ejemplo, incrementar la solubilidad y/o facilitar la purificación de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención. Ejemplos no limitantes incluyen pET32, pET41, pET43. Los vectores también pueden contener un polinucleótido adicional expresable que codifica una o más chaperonas para facilitar un plegamiento correcto de la proteína. Los huéspedes de expresión bacteriana adecuados comprenden por ejemplo cepas derivadas de BL21 (tal como BL21(DE3), BL21(DE3)PlysS, BL21 (DE3)RIL, BL21 (DE3)PRARE) o Rosetta®.
- Véase en Sambrook y Russel, 2001, técnicas de modificación de vectores.
- En general, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores de selección en el huésped, por ejemplo resistencia a antibióticos y uno o más casetes de expresión. Orígenes de replicación (ori) adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación de Col E1, del virus SV40 y de M 13.
- Las secuencias de codificación de acuerdo con la invención insertadas en el vector pueden sintetizarse mediante por ejemplo procedimientos estándar, o aislarse de fuentes naturales. La unión de las secuencias de codificación a los elementos de regulación de la transcripción y/o las otras secuencias de codificación de aminoácidos se puede llevar a cabo usando procedimientos establecidos. Los elementos de regulación de la transcripción (partes de un casete de expresión) que aseguran la expresión en células procariotas o eucariotas se conocen bien por los expertos en la técnica. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (p. ej., codón de iniciación de la traducción, promotores, potenciadores y/o aisladores), sitios internos de entrada en el ribosoma (IRES) (Owens, *et al.*, 2001) y opcionalmente, señales poli-A que aseguran la terminación de la

transcripción y la estabilización del transcrito. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores tanto de la transcripción como de la traducción, y/o regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está operativamente unida a dichas secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas. El vector puede comprender además secuencias nucleotídicas que codifican señales de secreción como elementos de regulación adicionales. Tales secuencias se conocen bien por el experto en la técnica. Además, dependiendo del sistema de expresión usada, las secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido expresado a un compartimento celular se pueden añadir a la secuencia codificadora de la molécula de ácido nucleico de la invención. Tales secuencias líder se conocen bien en la técnica. Los vectores diseñados específicamente permiten el transporte de ADN entre diferentes huéspedes, tales como bacterias-células fúngicas o bacterias-células animales.

Un vector de expresión de acuerdo con esta invención es capaz de dirigir la replicación y la expresión de la molécula de ácido nucleico de la invención y el polipéptido codificado de este modo.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento se pueden diseñar para la introducción directa o introducción mediante liposomas, vectores fágicos o vectores víricos (p. ej., adenovirus, retrovirus) en la célula. Adicionalmente, los sistemas de baculovirus o sistemas basados en virus de la variolovacuna o en el virus del bosque Semliki se pueden usar como vector en el sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico de la invención. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus de la variolovacuna, virus adenoasociado, herpesvirus o virus del papiloma bovino, se pueden usar para liberar los polinucleótidos o el vector en la población de células diana. Los procedimientos que se conocen bien por los expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores virales recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, 2001 y Ausubel, 2001.

Un vector de expresión en mamíferos típico contiene el elemento promotor que media en la iniciación de la transcripción de ARNm, la secuencia de codificación proteica y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Además, también se pueden incluir elementos tales como el origen de replicación, el gen de resistencia a fármacos, reguladores (como parte de un promotor inducible). Elementos adicionales podrían incluir potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para corte y empalme del ARN. Se puede conseguir una transcripción muy eficaz con los promotores tardío y temprano de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo RSV, HTLV1, HIV1 y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). No obstante, también se pueden usar elementos celulares (p. ej., el promotor de la actina humana). Otros ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas (la forma de realización más preferida) son el promotor AOX1 o GAL1 en levaduras o el promotor de la beta-actina de pollo, el promotor-CAG (una combinación del promotor de la beta-actina de pollo y el potenciador inmediato-temprano del citomegalovirus), el promotor gal10, el 1 α -promotor del factor de elongación humano, el potenciador de CMV, el promotor de CaM-cinasa, el promotor poliédrico del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) o un intrón de globina en las células de mamíferos y de otros animales. Además de los elementos que son responsables de la iniciación de la transcripción tales elementos reguladores pueden comprender también señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-tk de SV40 o las señales de poliadenilación poliédricas de los SV40, lacZ y AcMNPV, aguas abajo del polinucleótido.

La cotransfección con un marcador seleccionable, tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina, permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas. El ácido nucleico transfectado también se puede amplificar para expresar cantidades grandes del (poli)péptido codificado. El marcador dhfr (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles, de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al. 1991; Bebbington et al. 1992). Usando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Otros marcadores seleccionables incluyen G418 o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucariotas.

Los vectores de expresión adecuados para *Drosophila* son los pertenecientes al sistema pMT DES (Invitrogen) usando el promotor de la metalotioneína (MT) de *drosophila* (Bunch et al., 1988) o pAC5.1 usando el promotor de actina 5C de *drosophila*. Un vector que usa el promotor USA inducible por GAL4 es pUAST. Los vectores levaduras son el vector pYE_p (usando un promotor Gal10), pYX142 (vector de una sola copia) o pYX232 (plásmido 2 μ usando el promotor de la TPI triosefosfato isomerasa (ambos de Novagen)).

Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor *lac*, *trp* o *tac*, el promotor lacUVS o el promotor *trp* en *E. coli*. Marcadores seleccionables adecuados en células procariotas son genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias.

En otro aspecto diferente, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención.

Los huéspedes según la invención pueden ser células individuales u organismos pluricelulares no humanos.

Huéspedes procariotas adecuados comprenden por ejemplo bacterias de las especies *Escherichia*, *Streptomyces*, *Salmonella* o *Bacillus*. Células huésped eucariotas adecuadas son por ejemplo, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*. Células de insecto adecuadas para la expresión son células de *Drosophila S2* o *Spodoptera Sf9*.

- 5 Las células huésped de mamífero que se pueden usar incluyen Hela humanas, HEK293, H9 y células Jurkat, células NIH3T3 y C127 de ratón, células COS 1, COS 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón, células de melanoma de Bowes y células de ovario de hámster chino (CHO). También dentro del alcance de la presente invención están las células o líneas celulares de mamífero primarias. Las células primarias son células que se obtienen directamente de un organismo. Células primarias adecuadas son, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), hepatocitos primarios de ratón, cardiomiocitos y células neuronales, así como células madre de músculo de ratón (células satélite) y líneas celulares inmortalizadas estables derivadas de las mismas. Como alternativa, la molécula de ácido nucleico de la invención puede expresarse en líneas celulares estables que contienen la molécula de ácido nucleico de la invención, preferentemente el vector de la invención integrado en un cromosoma.
- 10
- 15 Medios de cultivo y condiciones adecuados para las células huésped descritas en lo que antecede se conocen en la técnica.

Los animales transgénicos no humanos como huéspedes transfectados con y/o que expresan la molécula de ácido nucleico de la presente invención también entran dentro del alcance de la invención. En una realización preferida, el animal transgénico es un mamífero, por ejemplo un hámster, ratón, rata, gato, cerdo, perro, caballo, conejo o mono.

- 20 Un procedimiento para la producción de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, comprende la introducción de la molécula de ácido nucleico o del vector dirigido de la presente invención en una célula germinal, una célula embrionaria, célula madre o un huevo o una célula derivada de la misma. El animal no humano puede usarse de acuerdo con la invención, por ejemplo en un procedimiento para la identificación de compuestos, descritos en el presente documento a continuación. La producción de embriones transgénicos y la detección selectiva de los mismos se pueden realizar, por ejemplo, como se describe por Joyner (1993). El ADN de las membranas embrionarias de los embriones se puede analizar utilizando, por ejemplo, transferencias de tipo Southern con una sonda apropiada, véase anteriormente. Un procedimiento general para la fabricación de animales no humanos transgénicos se describe en la técnica, véase por ejemplo el documento WO 94/24274. Para fabricar organismos no humanos transgénicos (que incluyen animales no humanos dirigidos de forma homóloga), se prefieren células madre embrionarias (células ES). Las células ES murinas, tales como la línea AB-1 cultivada en capas alimentadoras de células SNL76/7 mitóticamente inactivas (McMahon y Bradley, Cell 62:1073-1085 (1990)) esencialmente como se describen (Robertson, E. J. (1987) en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, p. 71-112) se pueden usar para la orientación génica homóloga. Otras líneas de ES adecuadas incluyen, entre otras, la línea E14 (Hooper et al. (1987), la línea D3 (Doetschman et al. (1985), la línea CCE (Robertson et al. (1986), la línea AK-7 (Zhuang et al. (1994). El éxito de generar una línea de ratón a partir de células ES potadoras de una mutación dirigida específica depende de la pluripotencia de las células ES (es decir, de su capacidad, una vez inyectadas en un embrión huésped en desarrollo, tal como un blastocisto o mórula, para participar en la embriogénesis y contribuir a las células germinales del animal resultante). Los blastocistos que contienen las células ES inyectadas pueden desarrollarse en el útero de hembras no humanas pseudopreñadas y nacer, por ejemplo, como ratones quiméricos. Los ratones transgénicos resultantes son quiméricos para las células que tienen los loci de la recombinasa o indicadores y se retrocruzan y someten a detección selectiva para determinar la presencia del/de los transgén/transgenes que es/son la(s) diana(s) correcta(s) mediante PCR o análisis de transferencia de tipo Southern sobre el ADN de biopsia de la cola de la descendencia con el fin de identificar los ratones transgénicos heterocigotos, para el locus/loci de la recombinasa o indicadores.
- 30
- 35
- 40
- 45 Las plantas transgénicas como huéspedes transfectados con y/o que expresan la molécula de ácido nucleico de la presente invención también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones adecuadas y aislar el polipéptido producido.

- 50 Dicha célula huésped expresa o sobreexpresa el polipéptido de la invención que se une específicamente al PCNA como se ha descrito en lo que antecede. De acuerdo ello, dicho polipéptido de la invención se produce en y se aísla de la célula huésped.

Las condiciones adecuadas para el cultivo de un huésped procariota o eucariota se conocen bien por el experto en la técnica. Por ejemplo, las condiciones adecuadas para el cultivo de las bacterias son su cultivo en aireación en medio de Luna Bertani (LB). Para aumentar el rendimiento y la solubilidad del producto de expresión, el medio se puede tamponar o complementar con aditivos adecuados que se sabe que potencian o facilitan ambos. *E coli* puede cultivarse a partir de 4 a aproximadamente 37 °C, la temperatura exacta o la secuencia de temperaturas depende de la molécula que se va a sobreexpresar. En general, el experto es consciente de que estas condiciones pueden tener que adaptarse a las necesidades del huésped y a los requisitos del polipéptido expresado. En caso de que un promotor inducible controle el ácido nucleico de la invención en el vector presente en la célula huésped, la expresión

- 55

del polipéptido puede inducirse mediante la adición de un agente inductor adecuado. El experto en la técnica conoce protocolos y estrategias de expresión adecuadas.

5 Dependiendo del tipo de célula y sus requisitos específicos, el cultivo de células de mamífero que es una realización preferida para producir el polipéptido puede llevarse a cabo, por ejemplo, en medio RPMI o DMEM que contiene 10 % (v/v) de FCS, L-glutamina 2 mM y 100 U/ml de penicilina/estreptomycin. Las células pueden mantenerse a 37 °C en un 5 % de CO₂, atmósfera saturada de agua.

Protocolos de expresión adecuados para células eucariotas se conocen bien por el experto en la técnica y pueden recuperarse por ejemplo de Sambrook, 2001.

10 Medios adecuados para el cultivo de células de insecto son, por ejemplo, TNM + 10 % de FCS o medio SF900. Las células de insecto generalmente se cultivan a 27 °C como cultivo de adhesión o en suspensión.

15 Los procedimientos de aislamiento del polipéptido producido se conocen bien en la técnica y comprenden sin limitaciones etapas de procedimiento tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel (cromatografía de exclusión por tamaño), cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), HPLC de fase inversa, electroforesis en gel de disco o inmunoprecipitación, véanse, por ejemplo, en Sambrook, 2001.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención o producido por el procedimiento de producción de un polipéptido de acuerdo con la invención. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID N.^{os}: 1, 15 o 17 o una secuencia de ácido nucleico degenerado con respecto a las SEC ID N.^{os}: 1, 15 o 17.

20 En una realización preferida, el polipéptido de la invención comprende además un marcador radiactivo.

Dicho marcador radiactivo puede estar unido al polipéptido durante o después de la expresión (recombinante). Marcadores radiactivos comprendidos en el polipéptido de la invención permiten la detección rápida e inmediata de la cantidad y/o ubicación de dicho polipéptido en células vivas.

25 La presente invención también se refiere a un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención, que, preferentemente, comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID N.^{os}: 1, 15 o 17 o una secuencia de ácido nucleico degenerado con respecto a las SEC ID N.^{os}: 1, 15 o 17, que tiene un colorante fluorescente acoplado al mismo.

30 Los colorantes fluorescentes de acuerdo con la presente invención son compuestos no proteínicos que emiten luz fluorescente tras la excitación. Ejemplos de colorantes fluorescentes son los de la familia Alexa (tales como Alexa Fluor 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700 y 750) cuyos espectros de emisión y de excitación cubren el espectro visible y se extienden dentro del infrarrojo, HiLyte Fluors (AnaSpec), DyLight Fluors (Pierce), la serie de colorantes ATTO (ATTO-TEC y Sigma-Aldrich) y también colorantes menos brillantes tales como rodamina y fluoresceína.

35 Los colorantes fluorescentes pueden estar, por ejemplo, acoplados de forma covalente a grupos amino primarios de aminoácidos, tales como lisina, de proteínas a través de la formación de éster N-hidroxisuccinimida (NHS).

40 El polipéptido de la invención marcado con un colorante fluorescente se puede utilizar por ejemplo para la detección del PCNA en aplicaciones de inmunofluorescencia e inmunotransferencia. Además se puede introducir en las células vivas utilizando diversas técnicas tales como transducción de proteínas (Schwarze et al., 2000) o liberación de proteínas utilizando por ejemplo lípidos catiónicos (proteofección) (Dalkara et al., 2004) como también se describirá más adelante en relación con los ácidos nucleicos.

En un aspecto diferente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una célula que contiene el ácido nucleico de la invención, que comprende introducir el ácido nucleico o el vector de la invención.

45 La expresión "introducción de un ácido nucleico" se refiere a la aplicación de un ácido nucleico a las células y su posterior captación e incorporación en el núcleo de dichas células, preferentemente en la información genética o en forma de episomas. Esta definición también puede aplicarse a los vectores que son específicos de los ácidos nucleicos.

50 Para las células animales, el proceso de introducción de un ácido nucleico normalmente se denomina transfección, transformación o transducción. Si se utilizan virus, el proceso se denomina infección o transducción. La transfección de células animales normalmente implica abrir poros transitorios o "agujeros" en la membrana plasmática de la célula para permitir la captación de material. Además de la electroporación, la transfección puede llevarse a cabo mediante diversos procedimientos de introducción de ADN extraño en una célula.

Un procedimiento es la transfección mediante fosfato cálcico (véase por ejemplo Nature Methods 2 (2005), 319-320). La solución salina tamponada con HEPES (HeBS) que contiene iones de fosfato se combina con una solución de cloruro cálcico que contiene el ADN que se va a transfectar. Cuando se combinan ambas soluciones, se formará un

precipitado fino del calcio cargado positivamente y el fosfato cargado negativamente, que se une al ADN que se va a transfectar sobre su superficie. A continuación se añade la suspensión del precipitado a las células a transfectarse (normalmente un cultivo de células cultivadas en una monocapa). Se han usado muchos materiales como vehículos para la transfección, entre ellos polímeros (catiónicos), liposomas y nanopartículas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5948878, Felgner et al., 1987; Martien et al., 2008). Tales procedimientos utilizan por ejemplo compuestos orgánicos altamente ramificados, así llamados dendrímeros, para unirse al ADN. Un procedimiento muy eficiente es la inclusión del ADN que se va a transfectar en liposomas capaces de fusionarse con la membrana celular, liberando el ADN en el interior de la célula. Para las células eucariotas, se usa más típicamente transfección basada en lípidos-cationes, porque las células son más sensibles. Otro procedimiento es el uso de polímeros catiónicos tales como DEAE-dextrano o polietilenimina. El ADN cargado negativamente se une al polímero y el complejo es captado por la célula a través de endocitosis. La transfección de material genético también puede efectuarse mediante electroporación (Neumann, E. et al., 1982, EMBO Journal, 1(7), 841-845; Potter, H., et al., 1984, PNAS, 81(22), 7161-7165).

Otros procedimientos de transfección incluyen nucleofección, choque térmico, magnetofección y reactivos de transfección tales como Lipofectamina™, Dojindo HilyMax, Fugene, jetPEI™, Effectene o DreamFect™.

Se prefiere que la introducción del ácido nucleico sea estable, es decir que resida de forma estable en el núcleo. Si el ácido nucleico introducido no codifica por sí mismo un marcador seleccionable que proporciona a la célula una ventaja de selección, tal como una resistencia frente a determinado herbicida, toxina o antibiótico que esté presente en el medio de crecimiento de las células y si el ácido nucleico introducido no se incorpora de manera estable en el núcleo, la incorporación puede estimularse mediante cotransformación con otro ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable de este tipo.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de la cantidad y/o ubicación del PCNA en células vivas que comprende (a) expresar en una célula eucariota el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención que codifica además un polipéptido fluorescente y un enlazador de al menos un aminoácido; y (b) detectar la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido en la célula tras la excitación, en el que la ubicación de la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido en la célula es indicativa de la presencia de PCNA.

La expresión "que se expresa en una célula eucariota" se refiere a la transcripción y traducción del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención que codifica además un polipéptido fluorescente y un enlazador de al menos un aminoácido, es decir la proteína de fusión de la invención, usando elementos de control de la expresión adecuados que funcionan en la célula elegida. De este modo, las propiedades de unión de las proteínas de fusión individuales de acuerdo con la invención se pueden analizar en sistemas de expresión celular. Para este fin, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión puede clonarse en un vector de expresión adecuado como se ha descrito anteriormente. Para esto y el siguiente aspecto de la presente invención, el sistema de expresión es eucariota, preferentemente mamífero.

El presente procedimiento simplifica la investigación básica sobre el ciclo celular proporcionando medios eficaces y fáciles de usar para detectar la presencia y en particular la ubicación del marcador destacado del ciclo celular PCNA.

De este modo, se puede aclarar la influencia de por ejemplo diferentes condiciones ambientales tales como la temperatura, los aditivos en el medio, la radiación y cualquier compuesto químico en el ciclo celular así como el comportamiento de proliferación de diferentes tipos de células. Además, como se describirá adicionalmente a continuación, la aplicabilidad *in vivo* del polipéptido de la invención es útil en la detección selectiva de fármacos que tienen una influencia sobre el ciclo celular. En particular permite estudiar los efectos inhibidores así como estimulantes de fármacos mediante la determinación del curso del ciclo celular en tiempo real analizando la distribución característica del PCNA en las diferentes etapas del ciclo celular. Con el polipéptido de la invención también se pueden distinguir distintas etapas del ciclo celular (Fase G1, fase S, fase G2 o mitosis) mediante análisis de la distribución celular del polipéptido que refleja la distribución del PCNA en la etapa concreta del ciclo celular.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de detección selectiva de compuestos que tienen un efecto sobre el ciclo celular que comprende (a) expresar en una célula eucariota el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido fluorescente, en el que dicho polipéptido fluorescente se separa de dicho polipéptido que se une específicamente al PCNA mediante un enlazador de al menos un residuo de aminoácidos; (b) poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo; y (c) detectar la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido tras la excitación; en el que un cambio en la cantidad y/o localización de la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido en la célula en comparación con lo observado en una célula eucariota de referencia que expresa el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención que además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido fluorescente y no está en contacto con el compuesto de ensayo es indicativo de que el compuesto tiene un efecto sobre el ciclo celular.

Un compuesto de ensayo puede ser, pero no está restringido a, un compuesto que pertenece a las clases de ácidos nucleicos, polipéptidos, péptidos (secuencias de aminoácidos de hasta 30 aminoácidos), aptámeros péptídicos,

aptámeros basados en ácidos nucleicos, ribozimas, moléculas pequeñas o anticuerpos o fragmentos de los mismos. El compuesto de ensayo puede ser cualquier compuesto químico.

5 Una ribozima (de la enzima de ácido ribonucleico, también denominada ARN enzima o ARN catalítico) es una molécula de ARN que cataliza una reacción química. Muchas ribozimas naturales catalizan su propia escisión o la escisión de otros ARN, pero también se ha encontrado que catalizan la actividad aminotransferasa del ribosoma.

Ejemplos de pequeños ARN de autoescisión bien caracterizados son las ribozimas martillo, horquilla, del virus de la hepatitis delta y las ribozimas dependientes de plomo seleccionadas *in vitro*. La organización de estos pequeños catalizadores contrasta con la de ribozimas más grandes, como el intrón del grupo I.

10 Los aptámeros son moléculas de ácido oligonucleico o peptídicas que se unen a una molécula diana. Los aptámeros normalmente se crean seleccionándolos a partir de una reserva grande de secuencias aleatorias, pero también existen aptámeros naturales en ribointerruptores. Los aptámeros se pueden usar para investigación básica y para fines clínicos como fármacos macromoleculares. Los aptámeros se pueden combinar con ribozimas para autoescindir en presencia de su molécula diana. Estas moléculas del compuesto tienen aplicaciones adicionales en investigación, industria y clínica. Más específicamente, los aptámeros se pueden clasificar como aptámeros de 15 ADN o ARN o aptámeros peptídicos. Mientras que el primero consiste en hebras (normalmente cortas) de oligonucleótidos, el último consiste en un dominio peptídico corto variable, unido por ambos extremos a un armazón proteico.

20 Los aptámeros de ácidos nucleicos son especies de ácidos nucleicos que se han manipulado mediante ciclos repetidos de selección *in vitro* o equivalente, SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para unirse a diversas dianas moleculares, tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos.

25 Los aptámeros peptídicos son (poli) péptidos que están diseñados para interferir con otras interacciones proteicas dentro de las células. Consisten en un bucle peptídico variable unido a ambos extremos de un armazón proteico. Esta doble restricción estructural incrementa considerablemente la afinidad de unión del aptámero peptídico a niveles comparables con la de un anticuerpo (intervalo nanomolar). Típicamente la longitud del bucle variable está compuesta de 10 a 20 aminoácidos y el armazón puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. Actualmente, la proteína bacteriana tioredoxina A es la proteína de armazón usada con mayor frecuencia, estando el bucle variable insertado dentro del sitio activo reductor, que es un bucle -Cys-Gly-Pro-Cys- en la proteína salvaje, siendo las dos cadenas laterales de cisteína capaces de formar un puente disulfuro. La selección 30 del aptámero peptídico se puede realizar usando sistemas diferentes, pero el más usado actualmente es el sistema de dos híbridos de levadura.

35 Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, policlonal o monoclonal. El término "anticuerpo" también comprende derivados del mismo que siguen conservando la especificidad de unión. Las técnicas para la producción de anticuerpos se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados. Los fragmentos de anticuerpos aplicables como compuestos de ensayo incluyen fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv o fragmentos scFv; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), *loc. cit.*

40 Una molécula pequeña de acuerdo con la presente invención puede ser orgánica o inorgánica y tiene un peso molecular de hasta 2.000 daltons, preferentemente no más de 1.000 daltons, lo más preferentemente no más de 800 daltons.

En una realización preferida, la detección se lleva a cabo usando un microscopio de fluorescencia.

45 Un microscopio de fluorescencia es un microscopio óptico usado para estudiar propiedades de sustancias orgánicas o inorgánicas usando los fenómenos de fluorescencia y fosforescencia en lugar de, o además de, reflejo y absorción. La muestra se ilumina con luz de una longitud de onda específica (o de longitudes de onda específicas) que se absorbe a través de los fluoróforos, causando que emitan longitudes de onda de luz más largas (de un color diferente al de la luz absorbida). La luz de iluminación se separa de la mucho más débil fluorescencia emitida a través del uso de un filtro de emisión. Los componentes típicos de un microscopio de fluorescencia son la fuente de luz (lámpara de descarga de arco de xenón o mercurio), el filtro de excitación, el espejo dicróico (o divisor de haz 50 dicromático) y el filtro de emisión. Los filtros y el espejo dicróico se eligen de forma que coincidan con las características de emisión y excitación del espectro del fluoróforo usado para marcar la muestra. La mayoría de los microscopios de fluorescencia en uso son microscopios de epifluorescencia (es decir, la excitación y la observación de la fluorescencia están encima de (epi) la muestra). Estos microscopios se han convertido en una parte importante en el campo de la biología, lo que abre las puertas a diseños de microscopios más avanzados, tales como el 55 microscopio de barrido láser confocal (CLSM) y el microscopio de fluorescencia de reflejo interno total (TIRF). Estas tecnologías son bien conocidas por el experto.

Los compuestos identificados con el presente procedimiento, también denominados compuestos principales, se pueden optimizar para llegar a un compuesto que se puede usar, por ejemplo, en una composición farmacéutica. Los procedimientos para la optimización de las propiedades farmacológicas de los compuestos identificados en las detecciones selectivas se conocen en la técnica y comprenden procedimientos de modificación de un compuesto identificado como un compuesto principal para conseguir: (i) sitio de acción modificado, espectro de actividad, especificidad de órgano y/o (ii) potencia mejorada y/o (iii) toxicidad disminuida (mejor índice terapéutico) y/o (iv) efectos secundarios disminuidos y/o (v) inicio modificado de la acción terapéutica, duración del efecto modificada y/o (vi) parámetros farmacocinéticos modificados (resorción, distribución, metabolismo y excreción), y/o (vii) parámetros fisicoquímicos modificados (solubilidad, higroscopicidad, color, sabor, olor, estabilidad, estado), y/o (viii) especificidad general mejorada, especificidad órgano/tejido mejorada y/o (ix) forma y vía de aplicación optimizadas mediante (i) esterificación de grupos carboxilo o (ii) esterificación de grupos hidroxilo con ácidos carboxílicos, o (iii) esterificación de grupos hidroxilo con, por ejemplo, fosfatos, pirofosfatos o sulfatos o hemi-succinatos, o (iv) formación de sales farmacéuticamente aceptables o (v) formación de complejos farmacéuticamente aceptables, o (vi) síntesis de polímeros farmacológicamente activos o (vii) introducción de restos hidrófilos u (viii) introducción/intercambio de sustituyentes en aromatos o cadenas laterales, cambio del patrón de sustituyentes, o (ix) modificación mediante introducción de restos isostéricos o bioisostéricos o (x) síntesis de compuestos homólogos o (xi) introducción de cadenas laterales ramificadas o (xii) conversión de sustituyentes alquilo en análogos cíclicos o (xiii) derivación del grupo hidroxilo en cetales, acetales, o (xiv) N-acetilación en amidas, fenilcarbamatos o (xv) síntesis de bases de Mannich, iminas o (xvi) transformación de cetonas o aldehídos en bases de Schiff, oximas, acetales, cetales, enolésteres, oxazolidinas, tiazolidinas o combinaciones de los mismos.

Las diversas etapas citadas anteriormente se conocen en general en la técnica. Incluyen o dependen de análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) (Kubinyi, "Hausch-Analysis and Related Approaches", VCH Verlag, Weinheim, 1992), bioquímica combinatoria, química clásica y otros (véase, por ejemplo, Holzgrabe y Bechtold, Deutsche Apotheker Zeitung 2000, 140(8): 813).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del ácido nucleico de la invención, el vector de la invención, la célula huésped de la invención, el polipéptido de la invención o se produce por el procedimiento de la invención en investigación biomédica *in vitro* o detección selectiva de fármacos *in vitro*.

A este respecto, las formas de realización descritas para el procedimiento de detección selectiva de compuestos que tienen un efecto sobre el ciclo celular de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente se aplican de igual forma al uso de acuerdo con la invención.

La detección selectiva de fármacos, por ejemplo, hace uso de la detección de distintas etapas del ciclo celular, como la fase S, la fase G1, la fase G2 o la mitosis en células que expresan el polipéptido de la invención después del tratamiento con compuestos de ensayo que pueden ser fármacos. Un compuesto puede ser pero no está restringido a un compuesto perteneciente a las clases de por ejemplo ácidos nucleicos, (poli) péptidos, aptámeros peptídicos, aptámeros a base de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas o anticuerpos o fragmentos de los mismos. El compuesto puede ser cualquier compuesto químico.

La investigación biomédica o la detección selectiva de fármacos incluye preferentemente la detección selectiva/identificación de compuestos que bloquean la entrada de una célula en fase S o que interfieren en la progresión de la fase S, que se puede llevar a cabo usando por ejemplo el procedimiento de detección selectiva de compuestos que tienen un efecto sobre el ciclo celular como se ha descrito anteriormente. Esto es de particular interés para identificar los posibles fármacos que pueden inhibir la replicación del genoma y por tanto tienen un impacto directo en el tratamiento del cáncer bloqueando la división celular.

Procedimientos de detección selectiva ejemplares incluyen poner en contacto las células que expresan el polipéptido de la invención con los compuestos de ensayo, por ejemplo en un formato de múltiples pocillos (96 pocillos, 384 pocillos u otros formatos), seguido de microscopia fluorescente de células vivas y detección de fluorescencia como se ha descrito anteriormente. Usando detección con imágenes y de fluorescencia de células vivas, el polipéptido de la invención se puede visualizar en el núcleo de una célula tras la unión al PCNA. De este modo, el PCNA endógeno se puede detectar en estructuras características derivadas de sitios de replicación que varían desde genes de replicación temprana (fase S temprana) a cromatina de replicación tardía en fase S tardía. Adicionalmente, a partir de la distribución del polipéptido de la invención dentro del núcleo se puede concluir si la célula está en fase G1, fase G2 o en mitosis.

Para la identificación de compuestos específicos que afectan al ciclo celular, la distribución y el patrón dinámico del polipéptido de la invención se pueden correlacionar directamente con la distribución del polipéptido de la invención en las células de referencia que no están en contacto con el compuesto de ensayo.

Las figuras muestran:

Figura 1: informe de alineación de las VHH contra el PCNA tras la selección por expresión en fagos (mediante CH.EMBnet.org Clustal W). (*) marca aminoácidos idénticos, (:) marca sustituciones conservadoras de aminoácidos, (.) marca sustituciones semiconservadoras de aminoácidos.

Figura 2: selección de PCNA-cromocuerpos funcionales intracelulares usando el ensayo F2H. (A) Inmovilización de GFP-PCNA en una estructura celular definida (foco Lacl dentro del núcleo). Coexpresión de PCNA-cromocuerpos marcados con fluorescencia roja. La detección de antígenos se visualiza mediante colocalización de la fluorescencia verde (antígeno) y rojo (cromocuerpo) en la estructura celular definida. (B) Inmovilización de PCNA-cromocuerpos fusionados a GFP en la estructura celular definida. Se llevó a cabo la coexpresión de RFP-PCNA. La detección de antígeno se visualiza mediante colocalización de la fluorescencia rojo (antígeno) y verde (cromocuerpo) en la estructura celular definida. Las regiones de codificación de los PCNA-cromocuerpos de unión al antígeno se determinaron mediante secuenciación de ADN.

Figura 3: visualización y detección de la fase S con un PCNA-cromocuerpo. Se muestran imágenes representativas de las células que expresan Cromocuerpo PCNA3p16-GFP. (A) Coexpresión del PCNA-Cromocuerpo con otros marcadores fluorescentes de la fase S (RFP-PCNA, HcRed-Ligasa) que colocalizan en sitios de replicación del ADN. (B) Imágenes confocales de células que expresan únicamente el PCNA-Cromocuerpo visualizando diferentes etapas de la fase S.

Figura 4: la progresión a la fase S no se inhibe mediante la expresión del cromocuerpo PCNA3616-GFP. (A) Conformación de la localización correcta del PCNA-Cromocuerpo mediante tinción con anticuerpos (inmunofluorescencias) usando el anticuerpo anti-PCNA (16D10). Las señales fluorescentes de PCNA-3p16-GFP (verde) colocalizan con PCNA endógeno marcado con anticuerpo anti-PCNA (16D10)-Alexa568 (rojo). (B) Los sitios de replicación del ADN se marcan por incorporación de BrdU durante un pulso de 5 minutos y se detectan con un anticuerpo anti-BrdU Alexa555 (aBrdU-A555; rojo). Durante 30 minutos más, PCNA3p16-GFP progresó a los focos de replicación adyacentes (verde) (C) Demostración de localización errónea típica de GFP-PCNA tras la sobreexpresión en células vivas. Detección de foco de replicación con el anticuerpo contra BrdU (aBrdU-A555).

Figura 5: imágenes representativas de un análisis de lapso de tiempo de células que expresan cromocuerpo PCNA3p16-GFP. Se muestra la progresión de una célula que expresa el cromocuerpo PCNA3p16-GFP a lo largo de diferentes etapas del ciclo celular comenzando desde G1 hasta G2 tardía.

Figura 6: Determinación de los niveles de proteínas. Análisis de inmunotransferencia de la cantidad de proteínas del GFP-PCNA expresadas de forma transitoria en comparación con el PCNA endógeno. La proteína se detectó usando un anticuerpo anti-PCNA (16D10). Las cantidades relativas de proteína se cuantificaron usando análisis de densitometría con imagen J.

Figura 7: comparación de la movilidad celular de GFP-PCNA frente a PCNA-Cromocuerpo con análisis FRAP (recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo, FRAP). (A) Imágenes representativas de FRAP seminuclear de células HeLa que expresan cromocuerpo PCNA3p16-GFP de GFP-PCNA. (B) Evaluación del análisis FRAP. PCNA-Cromocuerpo (PCNA3p16-GFP) muestra una tasa de recuperación significativamente más rápida (~ 35 s) que demuestra una interacción transitoria entre PCNA3p16-GFP y PCNA endógeno en células vivas.

Figura 8. (A) Imágenes de clones diferentes (#5.1; #9.1; #9.6) de una línea celular HeLa que expresa de forma estable PCNA-Cromocuerpo (PCNA3p16-GFP) mostrado en el canal de GFP. (B) Evaluación de un ensayo de proliferación que analiza las diferentes líneas celulares. Todas las tres líneas celulares PCNA3p16-GFP muestran niveles de expresión homogéneos, visualizan focos de replicación endógenos y tienen tasas de proliferación comparables a una línea celular estable que expresa GFP-PCNA. A partir de esto los autores de la presente invención concluyen que el PCNA-Cromocuerpo no muestra toxicidad celular y por tanto es bien adecuado para estudios adicionales.

Figura 9: alineación del polipéptido representado por la SEC ID NO: 2 con polipéptidos que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos (SEC ID N.ºs: 16 y 18). Dos sustituciones conservadoras presentes en las SEC ID N.ºs: 16 y 18 están en la región marco 1 y una sustitución conservadora presente en la SEC ID NO: 18 está en la región marco 2.

Figura 10: imágenes representativas de células que expresan el PCNA-Cromocuerpo (3p16) que representa la SEC 2 (fila superior) o polipéptidos que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos que representan PCNA-Cromocuerpo que representa la SEC ID NO: 16 o SEC ID NO: 18 de PCNA-Cromocuerpo. Se muestran los núcleos de células en la fase S temprana (fila superior), fase S media (fila media) o fase S tardía (última fila).

Figura 11: ensayo de mitosis con una línea celular HeLa que expresa de forma estable el cromocuerpo PCNA3p16-GFP (clon 9.6). (A) Una obtención de imagen con lapso de tiempo de células no tratadas (izquierda) y tras la adición de 0,1 µg/ml de Colcemida (derecha). Las células mitóticas se visualizan con PCNA-Cromocuerpo (PCNA 3p16). Se muestran imágenes seleccionadas de células tratadas y sin tratar antes y después (13 h) de la adición de Colcemida. Las células en mitosis están marcadas con una flecha. (B) Evaluación cuantitativa con adquisición de imágenes automatizada y reconocimiento de patrón computacional. Los cambios morfológicos de las células (n ~ 1.500) se monitorizaron a intervalos de 30 minutos. Se muestra el porcentaje de células en mitosis tras el tratamiento con Colcemida durante un periodo de tiempo de 13 h.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1:**Generación de anticuerpos que se unen a PCNA****Inmunización de alpaca:**

5 Se inmunizó una alpaca (Lamos pacos) con PCNA purificado recombinante en adyuvante GERBU de acuerdo con el esquema siguiente: día 0, 500 µg de PCNA; días 7, 14, 21, 35, 49 y 103: 125 µg de PCNA. El día 110 se extrajeron 100 ml de sangre.

Preparación de biblioteca de expresión en fagos:

10 Un total de 2×10^7 linfocitos B periféricos se aislaron de sangre (Lymphoprep™, de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Tras el aislamiento del ARNm y la síntesis de ADNc, los dominios variables de los anticuerpos de cadena pesada (VHH) de alpaca se amplificaron mediante PCR y se ligaron en el vector pHEN4c (Conrath et al., 2001). La transformación de la unión en las células TG1 tuvo como resultado una biblioteca de $1,5 \times 10^5$ colonias.

Adsorción de la biblioteca de expresión en fagos:

15 Para seleccionar los fagos que expresaron VHH que se unen al PCNA, se realizaron 3 rondas de adsorción contra PCNA purificado recombinante. Los clones de los fagos positivos que comprenden PCNA que se une a las VHH se detectaron en un ELISA en fase sólida. Para su caracterización adicional los clones positivos se secuenciaron y las respectivas secuencias proteicas se alinearon con secuencias proteicas positivas derivadas de secuencias de ADN de dominios VHH seleccionados de la detección selectiva de F2H (véase la Fig. 1).

Selección de clones positivos identificados mediante el ensayo de F2H tras la 1ª y la 3ª ronda de adsorción

20 Se seleccionaron los PCNA-cromocuerpos funcionales intracelulares positivos usando el ensayo de F2H divulgado en el documento PCT/EP2009/000067. Ejemplos de resultados de los mismos se representan en la Figura 2. Se alinearon las secuencias de ADN de los clones positivos de ELISA y F2H (Fig. 1). La alineación muestra un enriquecimiento de tres secuencias proteicas únicas que aparecían independientemente en ambas detecciones selectivas.

25 Las secuencias de PCNA1pD5-mRFP (F2H) y PCNA3pC8-GFP (F2H) fueron idénticas a la secuencia de PCNA1p15 (ELISA) y PCNA3pA4-mRFP (F2H) a PCNA3p10 (ELISA) y PCNA3p2 (ELISA). En el análisis *in vivo* posterior, no obstante, PCNA1pD5-mRFP y PCNA3pC8-GFP no reconocieron el PCNA endógeno en las células HeLa. Por el contrario PCNA3pF6-GFP pudo unirse al PCNA endógeno (datos no mostrados) y por tanto, se eligió para la posterior caracterización. A continuación este clon reivindicado se denomina PCNA3p16 (que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1) cuando se aplica como dominio VHH recombinante y PCNA3p16-GFP (que tiene la
30 secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 10) cuando se usa como cromocuerpo.

Ejemplo 2:**PCNA3p16-GFP se localiza en los sitios de replicación en las células HeLa y la progresión de la fase S no se impide**

35 Tras la identificación del cromocuerpo PCNA3p16-GFP en el ensayo F2H y ELISA, la unión del cromocuerpo al PCNA tenía que analizarse y caracterizarse después. En primer lugar, se investigó si PCNA3p16-GFP expresado de forma transitoria colocaliza con RFP-PCNA o HcRedLigasa, otro marcador de la fase S. Para hacerlo, las células HeLa se sembraron sobre cubreobjetos y se transfectaron doblemente de forma transitoria con vectores de expresión que codifican RFP-PCNA o HcRed-Ligasa y el vector que codifica PCNA-Cromocuerpo PCNA3p16-GFP. 24 horas después de la transfección se fijaron las células en PFA al 4 % durante 15 minutos a temperatura
40 ambiente, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,2 % en PBS y el ADN se contratiñó con DAPI. Los portaobjetos se montaron en VectaShield y se analizaron después mediante microscopia de epifluorescencia con los conjuntos de filtros adecuados para DAPI (D360_40X/HQ460_40M), GFP (HQ480_40X/HQ535_50M) y las proteínas fluorescentes rojas (HQ565_30X/HQ620_60M) y un objetivo de aceite 63X/1,3 NA Plan Apo. Como se esperaba, RFP-PCNA así como HcRed-Ligasa se localizó en los sitios de replicación del ADN en el núcleo de las células.
45 En ambos casos se detectó una colocalización de RFP-PCNA y HcRed-Ligasa con el cromocuerpo (Fig. 3 A). Este resultado sugiere que el PCNA-Cromocuerpo se localiza correctamente en los focos de replicación en las células. Para descartar que la localización correcta de PCNA3p16-GFP sea dependiente de la coexpresión de otras proteínas de replicación, las células HeLa se transfectaron con PCNA3p16-GFP solo. De nuevo fue visible una localización de PCNA3p16-GFP en los sitios de replicación, lo que indica que de hecho PCNA3p16-GFP es capaz
50 de unirse al PCNA endógeno en los sitios de replicación (Fig. 3 B).

Para confirmar que PCNA3p16-GFP reconoce el PCNA endógeno localizado en los sitios de replicación de ADN activos se realizó una tinción con anticuerpo contra PCNA y un pulso-seguimiento de BrdU. Para la detección de PCNA endógeno con anticuerpos convencionales se fijaron las células como se describe anteriormente y se permeabilizaron con metanol enfriado en hielo al 100 % durante 5 minutos. El anticuerpo anti-PCNA primario (clon

16D10) (1:400) se detectó mediante un anticuerpo secundario acoplado con el colorante fluorescente Alexa568.

Para visualizar los sitios de replicación activos se añadió BrdU al medio de las células en proliferación. Este análogo nucleotídico se capta por las células e incorporado en el ADN recién sintetizado durante la fase S. Tras 5 minutos se sustituye el medio que contiene BrdU por medio recién preparado. Las células se incuban durante 30 minutos y después se fijan con 4 % de PFA durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la permeabilización de las células con Triton, el BrdU incorporado se visualizó usando un kit de detección de BrdU con un anticuerpo anti-BrdU primario de ratón (1:500) y un anticuerpo anti-ratón secundario acoplado al colorante fluorescente Alexa555. El análisis microscópico (como se ha descrito anteriormente) de las células reveló que el cromocuerpo PCNA3p16-GFP (verde) está completamente colocalizado con la proteína PCNA endógena detectada con el anticuerpo anti-PCNA (16D10) (rojo) (**Fig. 4 A**). Estos resultados confirman el resultado anterior de que PCNA3p16-GFP se une a PCNA endógeno.

Como se ha descrito anteriormente, el BrdU se incorpora en el ADN recién sintetizado, de modo que se marcan los sitios de replicación activa del ADN en las células (rojo). Tras un periodo de seguimiento de 30 minutos fue visible que el patrón fluorescente de BrdU y el patrón PCNA3p16-GFP (verde) se habían desplazado ligeramente. Esta observación sugiere que el PCNA endógeno había progresado a focos de replicación adyacentes que indican que la unión de PCNA3p16-GFP al PCNA endógeno no impedía la progresión de la fase S (**Fig. 4 B**). En paralelo, el marcaje con BrdU se realizó en las células que sobreexpresan de forma transitoria GFP-PCNA. De un modo similar a las células que expresan PCNA3p16-GFP, la progresión de la fase S no estaba inhibida en las células que expresan GFP-PCNA. No obstante, se observó que la sobreexpresión de GFP-PCNA en ocasiones tiene como resultado un patrón fluorescente similar a un patrón de replicación aunque, como indica la tinción con BrdU, las células no estaban en fase S.

Ejemplo 3:

Serie de células vivas de una célula HeLa que expresa PCNA3p16-GFP

Para confirmar la progresión normal de las células HeLa que expresan PCNA3p16-GFP a través de la fase S se realizó una serie de células vivas. Las células HeLa se sembraron en portaobjetos μ de Ibidi en cámaras de células vivas y se transfectaron con el vector de expresión que codifica el cromocuerpo PCNA3p16-GFP. 12 horas después de la transfección de las células se inició una serie de células vivas durante 24 horas usando un microscopio confocal de disco rotatorio Perkin Elmer equipado con una campana de células vivas de temperatura controlada y un objetivo de aceite Zeiss 63X/1,4NA Plan Apo con imágenes adquiridas cada 15 minutos. La GFP se excitó con un láser a 488 nm. La serie de células vivas muestra que las células progresan a través de la fase S (**Fig. 5**).

Ejemplo 4:

Sobreexpresión de GFP-PCNA en comparación con el nivel de proteína PCNA endógeno en células HeLa

Para comparar el nivel de GFP-PCNA sobreexpresado con el nivel de PCNA endógeno 3×10^5 células HeLa se transfectaron de forma transitoria con un plásmido que codifica GFP-PCNA. 20 horas después de la transfección se determinó la eficiencia de la transfección y se preparó el lisado celular. El lisado celular se separó mediante SDS-PAGE y se analizó además mediante inmunotransferencia usando anticuerpos anti-PCNA (16D10). La cuantificación de la señal de inmunotransferencia mediante ImageJ reveló que GFP-PCNA se sobreexpresaba 15 veces más en comparación con los niveles de PCNA endógeno. No obstante, ya que solo el 25 % de las células se habían transfectado, el valor cuantificado se multiplicó por cuatro dando como resultado un nivel de proteínas de GFP-PCNA 60 veces más alto (**Fig. 6**).

Ejemplo 5:

Las mediciones FRAP de PCNA3p16-GFP revelan una unión transitoria, pero distinta del PCNA-cromocuerpo a los focos de replicación.

Para la caracterización de la afinidad de unión del cromocuerpo PCNA3p16-GFP al PCNA endógeno se realizó un análisis FRAP (recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo). Las células se cultivaron y se transfectaron en portaobjetos μ de Ibidi con construcciones de expresión indicadas. Para el análisis FRAP se usó un microscopio confocal Leica SP5 equipado con un objetivo de aceite 63X/1,4 NA Plan Apo. Se adquirieron 10 imágenes antes del blanqueo con un intervalo de tiempo de 1,3 segundos. Después se aplicó un pulso láser de intensidad máxima (488 nm) para blanquear una RDI rectangular (región de interés; normalmente la mitad del área del núcleo). Para monitorizar la recuperación fluorescente en el área blanqueada se adquirieron 70 imágenes con un intervalo de tiempo de 1,3 segundos y después 10 imágenes con un intervalo de tiempo de 5 segundos.

La **Figura 7 A** muestra imágenes representativas de FRAP seminuclear de células HeLa que expresan cromocuerpo PCNA3p16-GFP (PCNA-cb-GFP) o GFP-PCNA. La evaluación estadística de las mediciones de FRAP de varias células mostró una tasa de recuperación más rápida significativa (~ 35 s) de Cromocuerpo PCNA3p16-GFP en comparación con GFP-PCNA. Esto demuestra una interacción transitoria entre PCNA-Cromocuerpo y el PCNA endógeno en células vivas. La naturaleza transitoria de esta interacción es lo más probablemente la razón de que la

función de PCNA endógeno no se vea alterada ni impedida por la unión de PCNA3p16-GFP. No obstante, la unión sigue siendo lo bastante específica como para permitir la visualización de la proteína PCNA endógena en los focos de replicación a través de la fase S dentro de las células vivas (**Figura 7 B**).

Ejemplo 6:

5 **Análisis de generación y proliferación de 3 líneas celulares HeLa estables que expresan PCNA3p16-GFP**

La sobreexpresión transitoria de las proteínas en las células a menudo tiene como resultado niveles de expresión no homogéneos. Por tanto, se generaron líneas de células HeLa que expresan de forma estable PCNA3p16-GFP. Las células HeLa se sembraron a una densidad muy baja (1 % de confluencia) y se transfectaron con vectores de expresión de PCNA3p16-GFP. 2 días después de la transfección, las células se cultivaron en medio que contiene G418 para seleccionar las células transfectadas. Tras varios días se observó que las células que expresan PCNA3p16-GFP forman colonias. Se eligieron las colonias con niveles de expresión homogéneos y adecuados para la detección de los patrones de replicación (es decir, niveles de expresión que permiten la detección de PCNA3p16-GFP y una resolución espacial de estructuras focales) para su posterior subclonación. Por último, se seleccionaron tres clones 5.1, 9.1 y 9.6 (**Fig. 8 A**).

El comportamiento de proliferación de las tres líneas de células estables se analizó en un ensayo de proliferación y se comparó con la proliferación de células que expresan de forma estable GFP-PCNA. Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos y tras 1, 2 y 3 días se adquirieron imágenes usando un INCell Analyzer 1000 (GE Healthcare) equipado con un objetivo de aire 10X/0,45 NA Plan Apo. Las células se contaron por INCell workstation, un programa automático de evaluación y cuantificación de imágenes. Los clones 5.1 y 9.6 que expresan de forma estable PCNA3p16-GFP tenían tasas de proliferación comparables con la línea celular HeLa que expresa de forma estable GFP-PCNA. Las células del clon 9,1 proliferaron aproximadamente un 50 % más lentas que las células que expresan GFP-PCNA (**Fig. 8 B**). No obstante, las tres líneas celulares PCNA3p16-GFP muestran niveles de expresión homogéneos y visualizan los focos de replicación endógenos. Por tanto, son muy adecuadas para estudios adicionales.

25 **Ejemplo 7:**

Sustituciones conservadoras en las regiones marco no impiden la funcionalidad del polipéptido

Tras la identificación de un cromocuerpo PCNA3p16-GFP específico del PCNA (SEC ID NO: 2), se realizó un análisis adicional de los datos de secuencia de la biblioteca de PCNA-cromocuerpo para detectar secuencias de unión que comprenden sustituciones conservadoras en las regiones marco pero no en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que se sabe que son responsables de la unión al antígeno. Se seleccionaron dos secuencias de unión (secuencias de aminoácidos SEC ID NO: 16 y la SEC ID NO: 18, véase la Figura 9) para analizar la unión a PCNA en células vivas.

Para hacerlo, las células HeLa se sembraron sobre cubreobjetos y se transfectaron de forma transitoria con vectores de expresión que codifican una variante de PCNA-Cromocuerpo de la SEC ID NO: 16 y se fusionaron con GFP o una variante de PCNA-Cromocuerpo de la SEC ID NO: 18 y se fusionaron a GFP. 24 horas después de la transfección, se fijaron las células en PFA al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,2 % en PBS y el ADN se contratiñó con DAPI. Los portaobjetos se montaron en VectaShield y se analizaron además mediante microscopía de epifluorescencia con los conjuntos de filtros adecuados para DAPI (D360_40X/HQ460_40M) y GFP (HQ480_40X/HQ535_50M) y un objetivo de aceite 63X/1,3 NA.

Ambos cromocuerpos reconocen el PCNA y se localizan correctamente en los focos de replicación en las células. (véase la Figura 10). A partir de esto se puede concluir que las mutaciones conservadoras en el marco no interfieren con la capacidad de unión al antígeno de los correspondientes cromocuerpos.

Ejemplo 8:

45 **Detección selectiva de fármacos usando el ácido nucleico de la invención en el ejemplo del inductor de la mitosis colcemida**

Las líneas celulares HeLa que expresan de forma estable PCNA3p16-GFP (clon 9.6; secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 fusionada a GFP) se sembraron a una confluencia del 50 % en cámara de obtención de imágenes de células vivas (portaobjetos μ de 8 pocillos de Ibidi). Tras la incubación durante la noche, el medio de crecimiento normal (DMEM + 10 % de FCS) se sustituyó por medio para células vivas adaptadas con CO₂ (DMEM sin rojo fenol + 10 % de FCS + tampón Hepes 25 mM). Después el portaobjetos de imagen se colocó en un microscopio de alto contenido INCell Analyzer 1000 (GE Healthcare) equipado con una cámara de control ambiental, ajustada a 37 °C y al 5 % de CO₂. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de aire 20X/0,45 NA usando el conjunto de filtros adecuado para la proteína fluorescente GFP (HQ480_40X/HQ535_50M) y un tiempo de exposición de 750 ms. Para la obtención de imágenes de células vivas se seleccionaron 15 campos de visión por pocillo y se inició una serie temporal de 13 horas con intervalos de tiempo de 30 minutos. Después del primer punto temporal se añadieron 0,1 μ g/ml de colcemida directamente al medio de un pocillo; las células control se dejaron sin tratar (figura 11A). La

colcemida es un fármaco inhibidor de la mitosis tal como la colchicina, que despolimeriza los microtúbulos y limita la formación de microtúbulos (inactiva la formación de las fibras del huso), deteniendo así las células en la metafase.

5 El conjunto de datos adquiridos se analizó con el programa de evaluación y cuantificación de imágenes automatizado INCell workstation. Para ello se diseñó y desarrolló un protocolo especializado para identificar la célula, los núcleos y para distinguir entre las células en interfase y metafase. La cantidad de células mitóticas por punto de tiempo se contó y se evaluó. El gráfico representado en la figura 11B muestra el incremento esparado de las células mitóticas en la población de células tratadas con colcemida.

Referencias

- 10 Ando, R., H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno y A. Miyawaki. 2002. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99:12651-6.
- Bebbington, C.R., G. Renner, S. Thomson, D. King, D. Abrams y G.T. Yarranton. 1992. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biofechnology (N Y)*. 10:169-75.
- 15 Beddoe, T., M. Ling, S. Dove, O. Hoegh-Guldberg, R.J. Devenish, M. Prescott y J. Rossjohn. 2003. The production, purification and crystallization of a pocilloporin pigment from a reef-forming coral. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 59:597-9.
- Biocca, S., Neuberger, M.S. & Cattaneo, A. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *Embo J* 9, 101-108 (1990).
- 20 Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P. & Cattaneo, A. Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of xenopus oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 422-427 (1993).
- Biocca, S., Neuberger, M.S. & Cattaneo, A. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *Embo J.* 9, 101-108 (1990).
- Bravo R. et al., 1987, *Nature*, 326, p. 515-517.
- 25 Bulina, M.E., D.M. Chudakov, N.N. Mudrik y K.A. Lukyanov. 2002. Interconversion of Anthozoa GFP-like fluorescent and non-fluorescent proteins by mutagenesis. *BMC Biochem.* 3:7.
- Calcium phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells. *Nature Methods* 2, 319-320 (2005).
- Cardinale, A., Lener, M., Messina, S., Cattaneo, A. & Biocca, S. The mode of action of Y13-259 scFv fragment intracellularly expressed in mammalian cells. *FEBS Lett.* 439, 197-202 (1998).
- Cattaneo, A. & Biocca, S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol.* 17, 115-121 (1999).
- 30 Chalfie M., Kain S., *Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols*, Vol. 2, John Wiley and Sons, 2005 ISBN 0471736821, 9780471736820.
- Conrath, K.E. et al. (2001), *Antimicrob Agents Chemother.*, 45(10): 2807-2812.
- Dalkara et al., 2004, *Molecular Therapy* Vol. 9, N.º: 6.
- Doetschman et al., *J. Embryol. Exp. Morph.* 87:27-45 (1985).
- 35 Dove, S.G., O. Hoegh-Guldberg y S. Ranganathan. 2001. Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. *Coral Reefs.* 19:197-204.
- Fradkov et al., *Far_red fluorescent tag for protein labeling.* *Biochem J.* 2002, 368, 17_21.
- Gurskaya, N.G., A.F. Fradkov, A. Terskikh, M.V. Matz, Y.A. Labas, V.I. Martynov, Y.G. Yanushevich, K.A. Lukyanov y S.A. Lukyanov. 2001. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Lett.* 507:16-20.
- 40 Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- Hoogenboom H.R. et al., 1998, *Antibody phage display and its applications*, *Immunotechnology* 4:1-20.
- Hooper et al., *Nature* 326:292-295 (1987).
- Joyner, A. L. Ed., *Gene Targeting, A Practical Approach* (1993), Oxford University Press.
- 45 Kredel et al., (2009) *PLoS ONE*, VOI 4 (2).

- Kontermann, R.E. Intrabodies as therapeutic agents. *Methods* **34**, 163-170 (2004).
- Leonhardt H. et al., 1998, *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol 30/31 p 243-249.
- Lukyanov, K.A., A.F. Fradkov, N.G. Gurskaya, M.V. Matz, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, M.L. Markelov, A.G. Zraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan y S.A. Lukyanov. 2000. Natural animal coloration can Be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *J Biol Chem.* 275:25879-82.
- 5 Marasco, W.A., Chen, S., Richardson, J.H., Ramstedt, U. & Jones, S.D. Intracellular antibodies against HIV-1 envelope protein for AIDS gene therapy. *Hum. Gene. Ther.* 9, 1627-1642 (1998).
- Matz, M.V., A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zraisky, M.L. Markelov y S.A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol.* 17:969-73.
- 10 McMahon y Bradley, *Cell* 62:1073-1085 (1990.)
- Murphy, G., M.I. Cockett, R.V. Ward y A.J. Docherty. 1991. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J.* 277 (Pt 1):277-9.
- Pluckthun A, 1994, *Escherichia coli* producing recombinant antibodies, *Bioprocess Technol.* 19:233-252.
- 15 Sambrook, J y Russell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor 2001.
- Robertson, E. J. (1987); *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*.
- Robertson et al., *Nature* 323:445-448 (1986).
- Rottach et al., 2008, *Hybridoma*, Vol. 27, N.º: 2.
- Schwarze et al., 2000, *Trends in Cell Biology*, Vol. 10.
- 20 Shaner et al., 2007, *Journal of Cell Science* Vol 120(24)
- Shu, X et al., 2009, *Science* Vol 324.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67:509-44.
- Tu, H., Q. Xiong, S. Zhen, X. Zhong, L. Peng, H. Chen, X. Jiang, W. Liu, W. Yang, J. Wei, M. Dong, W. Wu y A. Xu. 2003. A naturally enhanced green fluorescent protein from magnificent sea anemone (*Heteractis magnifica*) and its functional analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:879-85.
- 25 Verma R. et al, 1998, *Antibody engineering: comparision of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems*, *J. Immunol. Methods* 216:165-181
- Wiedenmann, J., C. Elke, K.D. Spindler y W. Funke. 2000. Cracks in the beta-can: fluorescent proteins from *Anemonia sulcata* (Anthozoa, Actinaria). *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 97:14091-6.
- 30 Zacharias, D. A.; Violin, J. D.; Newton, A. C. and Tsien, R. (2002) Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells; *Science* 296: 913-16.
- Zhang, J., R.E. Campbell, A.Y. Ting y R.Y. Tsien. 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:906-18.
- Zhuang et al., *Cell* 77:875-884 (1994).
- 35 Zimmer, M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev.* 102:759-81.

Listado de secuencias

<110> Ludwig-Maximilians-Universitat München

<120> Detección y visualización del ciclo celular en células vivas

<130> R1679 PCT

5 <150> EP 09 00 8827.9

<151> 6-7-2009

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

10 <211> 368

<212> ADN

<213> Lamos pacos

<400> 1

```

atggctcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tgcaacctgg ggggtctctg      60
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atgctatgag ctgggtccgc      120
caggctccag gaaaggggct cgagtgggtc tcagatatta gtcttagtgg tgctgtcaag      180
gcctattcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaacgc caagaacaga      240
ctgtatctgc aatgaacag cctgacacct gaggacacgg gcgaatattt ttgtactaaa      300
gtccagtcct caggtacgag aatacctgcc ccctcgagcc aggggaccca ggtcaccgtc      360
tcctcaag                                         368
    
```

15 <210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Lamos pacos

<400> 2

```

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1           5           10           15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20           25           30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35           40           45

Trp Val Ser Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
 50           55           60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
 65           70           75           80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
 85           90           95
    
```

20

ES 2 528 603 T3

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
 100 105 110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 717

<212> ADN

5 <213> Aequorea victoria

<400> 3

atgagtaaag gagaagaact ttcactgga gttgtcccaa ttcttggtga attagatggt 60
 gatgtaaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aagtgatgc aacatacggg 120
 aaacttacc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg gccaacactt 180
 gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcaagat acccagatca tatgaaacag 240
 catgactttt tcaagagtgc catgcccgaagggttatgtac aggaaagaac tatatttttc 300
 aaagatgacg ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt ttgaaggtga tacccttggt 360
 aatagaatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa 420
 ttggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga 480
 atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 540
 cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600
 ctgtccacac aatctgcctt ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt 660
 ctgaggtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaataa 717

<210> 4

<211> 238

10 <212> PRT

<213> Aequorea victoria

<400> 4

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
 50 55 60
 Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln

ES 2 528 603 T3

65						70										75						80
	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg						
					85					90					95							
	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val						
					100				105						110							
	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile						
			115					120					125									
	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn						
			130				135					140										
	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly						
						150					155					160						
	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val						
					165					170					175							
	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro						
				180					185					190								
	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser						
			195					200					205									
	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val						
			210				215					220										
	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys								
					225		230				235											

<210> 5

<211> 711

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: mCherry"

<400> 5

atggtgagca agggcgagga ggataacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag	60
gtgcacatgg agggctccgt gaacggccac gagttogaga tcgagggcga gggcgagggc	120
cgccccctacg agggcaccca gaccgccaag ctgaaggatga ccaagggatgg cccctgccc	180
ttcgctggg acatcctgtc ccctcagttc atgtacggct ccaaggccta cgtgaagcac	240
cccgccgaca tccccgacta cttgaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc	300
gtgatgaact tcgaggacgg cggcgtggg accgtgacce aggactcctc cctgcaggac	360
ggcgagttca tctacaaggt gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cggccccgta	420

ES 2 528 603 T3

atgcagaaga agaccatggg ctgggaggcc tcctccgagc ggatgtaccg cgaggacggc 480
 gccctgaagg gcgagatcaa gcagaggctg aagctgaagg acggcggcca ctacgacgct 540
 gaggtcaaga ccacctacaa ggccaagaag cccgtgcagc tgcccggcgc ctacaacgct 600
 aacatcaagt tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccacgtgga acagtacgaa 660
 cgcgcccagg gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaagta a 711

<210> 6

<211> 236

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: mCherry"

<400> 6

Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Asp	Asn	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Phe	1	5	10	15
Met	Arg	Phe	Lys	Val	His	Met	Glu	Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	20	25	30	
Glu	Ile	Glu	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	Thr	Gln	Thr	35	40	45	
Ala	Lys	Leu	Lys	Val	Thr	Lys	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Trp	Asp	50	55	60	
Ile	Leu	Ser	Pro	Gln	Phe	Met	Tyr	Gly	Ser	Lys	Ala	Tyr	Val	Lys	His	65	70	75	80
Pro	Ala	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	85	90	95	
Lys	Trp	Glu	Arg	Val	Met	Asn	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Val	Val	Thr	Val	100	105	110	
Thr	Gln	Asp	Ser	Ser	Leu	Gln	Asp	Gly	Glu	Phe	Ile	Tyr	Lys	Val	Lys	115	120	125	
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Lys	130	135	140	
Thr	Met	Gly	Trp	Glu	Ala	Ser	Ser	Glu	Arg	Met	Tyr	Pro	Glu	Asp	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Lys	Gly	Glu	Ile	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Leu	Lys	Asp	Gly	Gly	165	170	175	

ES 2 528 603 T3

His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val
 180 185 190

Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
 195 200 205

His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
 210 215 220

Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 7

<211> 759

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: YFP"

<400> 7

```

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac      60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac      120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc      180
ctcgtgacca ccttcgggta cggcctgaag tgcttcgccc gctacccoga ccacatgaag      240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc      300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg      360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac      420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac      480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc      540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac      600
tacctgagct accagtccaa gctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc      660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgcca tggacgagct gtacaaggct      720
ggtaaccgagc tcggatccac tagtaacggc cgccagtgt      759
    
```

10 <210> 8

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: YFP"

<400> 8

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

ES 2 528 603 T3

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 9

<211> 1149

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: PCNA3p16-GFP (incluyendo el enlazador)"

<400> 9

ES 2 528 603 T3

```

atggctcagg tgcagctggt ggagctctggg ggaggcttgg tgcaacctgg ggggtctctg      60
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atgctatgag ctgggtccgc      120
caggctccag gaaaggggct cgagtgggtc tcagatatta gtcctagtgg tgctgtcaag      180
gcctattcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaacgc caagaacaga      240
ctgtatctgc aatgaacag cctgacacct gaggacacgg gcgaatattt ttgtactaaa      300
gtccagtccc cacgtacgag aatacctgcc cctctgagcc aggggaccca ggtcaccgtc      360
tcctcaagaa gcttcgaatt ctgcagtcga cgggtaccgc gggccgggat ccaccggccg      420
gtcgcacca tggtgagcaa gggcgaggag ctggtcaccg ggggtggtgcc catcctggtc      480
gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt cggcgaggg cgagggcgat      540
gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca cgggcaagct gccctgccc      600
tgccccacc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctacccccgac      660
cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc      720
accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gtcgagggc      780
gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcctcgact tcaaggagga cggcaacatc      840
ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag      900
cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg      960
cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc     1020
gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat     1080
cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg     1140
tacaagtaa                                     1149

```

<210> 10

<211> 382

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: PCNA3p16-GFP (incluyendo el enlazador)"

<400> 10

```

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1                               5                               10                               15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
                20                25                30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35                40                45

```

ES 2 528 603 T3

Trp Val Ser Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
 85 90 95

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
 100 105 110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Ser Phe Glu Phe Cys
 115 120 125

Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Pro Gly Ile His Arg Pro Val Ala Thr Met
 130 135 140

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 145 150 155 160

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 165 170 175

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 180 185 190

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 195 200 205

Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 210 215 220

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 225 230 235 240

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 245 250 255

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 260 265 270

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 275 280 285

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 290 295 300

ES 2 528 603 T3

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
305 310 315 320

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
325 330 335

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
340 345 350

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
355 360 365

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
370 375 380

<210> 11

<211> 1140

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: PCNA3p16-mCherry (incluyendo el enlazador)"

<400> 11

atggctcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tgcaacctgg ggggtctctg 60
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atgctatgag ctgggtccgc 120
 caggctccag gaaaggggct cgagtgggtc tcagatatta gtcctagtgg tgctgtcaag 180
 gcctattcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaacgc caagaacaga 240
 ctgtatctgc aatgaacag cctgacacct gaggacacgg gcgaatattt ttgtactaaa 300
 gtccagtcce cacgtacgag aatacctgcc ccctcgagcc aggggaccca ggtcacctgc 360
 tcctcaagaa gcttcgaatt ctgcagtcca cggtagccgc ggccccggat ccaccggccg 420
 gtgcgccacca tgggtgagcaa gggcgaggag gataacatgg ccatcatcaa ggagttcatg 480
 cgcttcaagg tgcacatgga gggtccgtg aacggccacg agttcgagat cgagggcgag 540
 ggcgagggcc gccctacga gggcaccacg accgccaagc tgaaggtgac caaggggtggc 600
 ccctgcctct tcgectggga catcctgtcc cctcagttca tgtacggctc caaggcctac 660
 gtgaagcacc ccgccgacat ccccgactac ttgaagctgt ccttccccga gggcttcaag 720
 tgggagcgcg tgatgaactt cgaggacggc ggcgtggtga ccgtgaccca ggactcctcc 780
 ctgcaggacg gcgagtcat ctacaaggtg aagctgcgcg gcaccaactt ccctccgac 840
 ggccccgtaa tgcagaagaa gaccatgggc tgggaggcct cctccgagcg gatgtacccc 900
 gaggacggcg ccctgaaggg cgagatcaag cagaggctga agctgaagga cggcggccac 960
 tacgacgctg aggtcaagac cacctacaag gccaaagaagc ccgtgcagct gcccggcgcc 1020
 tacaacgtca acatcaagtt ggacatcacc tcccacaacg aggactacac catcgtggaa 1080
 cagtacgaac gcgccgaggg ccgccactcc accggcggca tggacgagct gtacaagtaa 1140

10

<210> 12

ES 2 528 603 T3

<211> 379

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: PCNA3p16-mCherry (incluyendo el enlazador)"

<400> 12

```

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1                    5                      10          15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
          20                      25          30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35                      40          45

Trp Val Ser Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
 50                      55          60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
 65                      70          75          80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
          85                      90          95

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
          100                     105          110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Ser Phe Glu Phe Cys
          115                     120          125

Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Pro Gly Ile His Arg Pro Val Ala Thr Met
 130                     135          140

Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met
 145                     150          155          160

Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu
          165                     170          175

Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala
          180                     185          190

Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile

```

ES 2 528 603 T3

	195		200		205														
Leu	Ser	Pro	Gln	Phe	Met	Tyr	Gly	Ser	Lys	Ala	Tyr	Val	Lys	His	Pro				
	210					215					220								
Ala	Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	Lys				
	225				230					235					240				
Trp	Glu	Arg	Val	Met	Asn	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Val	Val	Thr	Val	Thr				
				245					250					255					
Gln	Asp	Ser	Ser	Leu	Gln	Asp	Gly	Glu	Phe	Ile	Tyr	Lys	Val	Lys	Leu				
			260				265						270						
Arg	Gly	Thr	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Lys	Thr				
		275					280					285							
Met	Gly	Trp	Glu	Ala	Ser	Ser	Glu	Arg	Met	Tyr	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala				
	290					295					300								
Leu	Lys	Gly	Glu	Ile	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Leu	Lys	Asp	Gly	Gly	His				
	305				310					315					320				
Tyr	Asp	Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Lys	Pro	Val	Gln				
				325					330					335					
Leu	Pro	Gly	Ala	Tyr	Asn	Val	Asn	Ile	Lys	Leu	Asp	Ile	Thr	Ser	His				
			340					345					350						
Asn	Glu	Asp	Tyr	Thr	Ile	Val	Glu	Gln	Tyr	Glu	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg				
		355					360					365							
His	Ser	Thr	Gly	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys									
	370					375													

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: péptido enlazador"

<400> 13

Arg	Ser	Phe	Glu	Phe	Cys	Ser	Arg	Arg	Tyr	Arg	Gly	Pro	Gly	Ile	His
1				5					10					15	

Arg	Pro	Val	Ala	Thr
			20	

10 <210> 14

<211> 20

<212> PRT

ES 2 528 603 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: péptido enlazador"

<400> 14

Ser Arg Ser Leu Ser Ile Pro Ser Thr Val Pro Arg Ala Arg Asp Pro
1 5 10 15

5 **Pro Val Asp Met**
20

<210> 15

<211> 366

<212> ADN

<213> Lamos pacos

10 <400> 15

atggctaacg tgcagctgaa tgagtctggg ggaggcttgg tgcaacctgg ggggtctctg 60
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atgctatgag ctgggtccgc 120
 caggetccag gaaaggggct cgagtgggtc tcagatatta gtcctagtgg tgctgtcaag 180
 gcctattcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaacgc caagaacaga 240
 ctgtatctgc aatgaacag cctgacacct gaggacacgg gcgaatattt ttgtactaaa 300
 gtccagtccc cacgtacgag aatacctgcc ccctcgagcc aggggaccca ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

15 <213> Lamos pacos

<400> 16

Met Ala Asn Val Gln Leu Asn Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ser Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
65 70 75 80

ES 2 528 603 T3

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
 85 90 95

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
 100 105 110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 366

<212> ADN

5 <213> Lamos pacos

<400> 17

atggctaacg tgcagctgaa tgagtctggg ggaggcttgg tgcaacctgg ggggtctctg 60
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagttcgt atgetatgag ttgggtccgc 120
 caggctccag gaaaggggct cgagtgggtc tccgagatta gtcctagtgg tgctgtcaag 180
 gcctattcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaacgc caagaacaga 240
 ctgtatctgc aatgaacag cctgacacct gaggacacgg gcgaatattt ttgtactaaa 300
 gtccagtcctc cacgtaacgag aatacctgcc ccctcgagcc aggggaccca ggtcacctgc 360
 tcctca 366

<210> 18

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Lamos pacos

<400> 18

Met Ala Asn Val Gln Leu Asn Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
 85 90 95

ES 2 528 603 T3

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
 100 105 110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19

<211> 1149

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: ácido nucleico que codifica el aglutinante de la SEC ID NO: 16 fusionada a GFP (incluyendo el enlazador)"

<400> 19

```

atggctaacg tgcagctgaa tgagtctggg ggaggcttgg tgcaacctgg ggggtctctg      60
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atgctatgag ctgggtccgc      120
caggctccag gaaaggggct cgagtgggtc tcagatatta gtcctagtgg tgctgtcaag      180
gcctattcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaacgc caagaacaga      240
ctgtatctgc aatgaacag cctgacacct gaggacacgg gcgaatattt ttgtactaaa      300
gtccagtccc cacgtacgag aatacctgcc ccctcgagcc aggggaccca ggtcacctgc      360
tcctcaagaa gcttcgaatt ctgcagtcga cgggtaccgc gggccgggat ccaccggccg      420
gtcgccacca tgggtgagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtgtgcc catcctggtc      480
gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat      540
gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gccctgccc      600
tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgcac      660
cacatgaagc agcagcactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc      720
accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc      780
gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcctcgact tcaaggagga cggcaacatc      840
ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag      900
cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg      960
cagctcgccc accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc     1020
gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaaag accccaacga gaagcgcgat     1080
cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg     1140
tacaagtaa                                     1149
    
```

10

<210> 20

<211> 382

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: enlazador de la SEC ID NO: 16 fusionado a GFP (incluyendo el

ES 2 528 603 T3

enlazador)"

<400> 20

Met Ala Asn Val Gln Leu Asn Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ser Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
 85 90 95

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
 100 105 110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Ser Phe Glu Phe Cys
 115 120 125

Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Pro Gly Ile His Arg Pro Val Ala Thr Met
 130 135 140

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 145 150 155 160

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 165 170 175

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 180 185 190

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 195 200 205

Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 210 215 220

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 225 230 235 240

ES 2 528 603 T3

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 245 250 255

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 260 265 270

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 275 280 285

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 290 295 300

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 305 310 315 320

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 325 330 335

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 340 345 350

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 355 360 365

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 370 375 380

<210> 21

<211> 1149

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: ácido nucleico que codifica el aglutinante de SEC ID NO: 18 fusionado a GFP (incluyendo el enlazador)"

<400> 21

atggctaacg tgcagctgaa tgagtctggg ggaggcttgg tgcaacctgg ggggtctctg 60

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagttcgt atgctatgag ttgggtccgc 120

caggctccag gaaaggggct cgagtgggtc tccgagatta gtcttagtgg tgetgtcaag 180

gcctattcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaacgc caagaacaga 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgacacct gaggacacgg gcgaatattt ttgtactaaa 300

gtccagtccc cacgtacgag aatacctgcc ccctcgagcc aggggaccca ggtcaccgtc 360

tcctcaagaa gcttcgaatt ctgcagtcga cgggtaccgcg ggcccgggat ccaccggccg 420

gtcgccacca tgggtgagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgcc catcctggtc 480

gagctggacg ggcacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat 540

gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccggtgcc 600

10

```

tgccccaccc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac 660
cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc 720
accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc 780
gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcctcgact tcaaggagga cggcaacatc 840
ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag 900
cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg 960
cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcgccg acggccccgt gctgctgccc 1020
gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat 1080
cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcgcat ggacgagctg 1140
tacaagtaa 1149

```

<210> 22

<211> 382

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: aglutinante de SEC ID NO: 18 fusionado a GFP (incluyendo el enlazador)"

<400> 22

```

Met Ala Asn Val Gln Leu Asn Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
1                    5                      10                15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
                20                25                30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                35                40                45

Trp Val Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
                50                55                60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
65                70                75                80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
                85                90                95

Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
                100                105                110

Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Ser Phe Glu Phe Cys
                115                120                125

```

10

ES 2 528 603 T3

Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Pro Gly Ile His Arg Pro Val Ala Thr Met
 130 135 140

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 145 150 155 160

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 165 170 175

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 180 185 190

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 195 200 205

Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 210 215 220

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 225 230 235 240

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 245 250 255

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 260 265 270

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 275 280 285

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 290 295 300

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 305 310 315 320

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 325 330 335

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 340 345 350

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 355 360 365

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 370 375 380

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une específicamente al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que se desvía de la SEC ID N.º por sustitución conservadora de uno o más aminoácidos en la posición 1 a 28, 38 a 52, 63 a 98 y 115 a 123 de la SEC ID NO: 2.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende o consiste en
 - (a) la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.ºs: 1, 15 o 17; o
 - (b) una secuencia de ácido nucleico degenerado con respecto a la secuencia de ácido nucleico de (a).
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador peptídico o proteínico visualmente detectable.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que dicho marcador peptídico o proteínico detectable visualmente es un polipéptido fluorescente, en el que dicho polipéptido fluorescente se separa de dicho polipéptido que se une específicamente a PCNA por un enlazador de al menos un residuo de aminoácido.
5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4, en la que dicho polipéptido fluorescente es GFP, RFP o YFP.
6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5, en la que el polipéptido que se une específicamente al PCNA se localiza en el extremo N de dicho polipéptido fluorescente.
7. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.ºs: 9, 11, 19 o 21 o que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las SEC ID N.ºs: 10, 12, 20 o 22.
8. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el vector de la reivindicación 8.
10. Un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Un procedimiento de producción de un polipéptido de la reivindicación 10 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 en condiciones adecuadas y aislar el polipéptido producido.
12. Un polipéptido
 - (a) codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que tiene un colorante fluorescente acoplado al mismo; o
 - (b) producido por el procedimiento de la reivindicación 11.
13. Un procedimiento de detección de la cantidad y/o localización del PCNA en una célula eucariota viva, que comprende
 - a. expresar en dicha célula el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7; y
 - b. detectar la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido en la célula tras la excitación; en el que la ubicación de la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido en la célula es indicativa de la presencia de PCNA.
14. Un procedimiento de detección selectiva de compuestos que tienen un efecto sobre el ciclo celular que comprende
 - a. expresar en una célula eucariota el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7;
 - b. poner en contacto la célula con un compuesto de ensayo; y
 - b. detectar la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido tras la excitación; en el que un cambio en la cantidad y/o ubicación de la emisión de fluorescencia de la parte fluorescente de dicho polipéptido en la célula en comparación con la observada en una célula eucariota de referencia que expresa el

polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 y no en contacto con el compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto tiene un efecto sobre el ciclo celular.

5 15. Uso del ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el vector de la reivindicación 8, la célula huésped de la reivindicación 9, el polipéptido de la reivindicación 10 o 12 o producido por el procedimiento de la reivindicación 11 en investigación biomédica o detección selectiva de fármacos *in vitro*.

Figura 1

	CDR1	CDR2	
PCNA1pD5-mRFP	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLSVVRQAPGKGLWVSD	[G]FSGAVKAYSDSV	
PCNA1pG3-mRFP	MAQVQLVESGGGSVRAQDLSRLSCASSQRTFPGPNMAIFRRGGPGQERFVAA	ITSRDSKTYADSA	F2H
PCNA3pA4-mRFP	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3pA6-mRFP	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3pA9-mRFP	MADVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3pC8-GFP	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRGFALGNFRQAPGKEREGVSC	[I]TTTGAITTYADSA	
PCNA3pD6-GFP	MAQVQLVESGGGSVRAQDLSRLSCASSQRTFPGPNMAIFRRGGPGQERFVAA	ITSRDSKTYADSA	
PCNA3pF6-GFP	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA1p11	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRGFALGNFRQAPGKEREGVSC	[I]TTTGAITTYADSA	
PCNA1p15	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRGFALGNFRQAPGKEREGVSC	[I]TTTGAITTYADSA	
PCNA3p2	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	ELISA
PCNA3p5	MAQVQLVESGGGMVQPGGSLRLSCAASRFTFSNYAMSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3p9	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAYKAMTVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3p12	MADVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMNVVRHSPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3p15	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3p16	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3p18	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3p20	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMNVVRHSPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
PCNA3p24	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRGFALGNFRQAPGKEREGVSC	[I]TTTGAITTYADSA	
PCNA3p29	MAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAYKAMTVVRQAPGKGLWVSD	[I]SPSGAVKAYSDSV	
	**:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:*		
	CDR3		
PCNA1pD5-mRFP	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTAVYYCAANRG-L	-----GVNKLLR--GGQTQVTVSS	
PCNA1pG3-mRFP	KGRFTISRDNAKRTVYVYLMNMLKPEDTAVYYCAVALRFIGGVCQKVVLTQRPSDTRG	QGTQVTVSS	
PCNA3pA4-mRFP	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3pA6-mRFP	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3pA9-mRFP	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3pC8-GFP	KGRFTISRDNAKNTVYVYLMNMLKPDPTAVYYCAADKNYYCS	-----TSAFFRYNLYDIWQGTQVTVSS	
PCNA3pD6-GFP	KGRFTISRDNAKRTVYVYLMNMLKPEDTAVYYCAVALRFIGGVCQKVVLTQRPSDTRG	QGTQVTVSS	
PCNA3pF6-GFP	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA1p11	KGRFTISRDNAKNTVYVYLMNMLKPDPTAVYYCAADKNYYCS	-----TSAFFRYNLYDIWQGTQVTVSS	
PCNA1p15	KGRFTISRDNAKNTVYVYLMNMLKPDPTAVYYCAADKNYYCS	-----TSAFFRYNLYDIWQGTQVTVSS	
PCNA3p2	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	F2H
PCNA3p5	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3p9	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3p12	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3p15	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3p16	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3p18	KGRFTISRDNAKNTVYVYLMNMLKPDPTAVYYCAADKNYYCS	-----TSAFFRYNLYDIWQGTQVTVSS	
PCNA3p20	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
PCNA3p24	KGRFTISRDNAKNTVYVYLMNMLKPDPTAVYYCAADKNYYCS	-----TSAFFRYNLYDIWQGTQVTVSS	
PCNA3p29	KGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQ-S	-----PRTRIPAPSSQGTQVTVSS	
	::* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:*		
	ELISA		

Figura 2

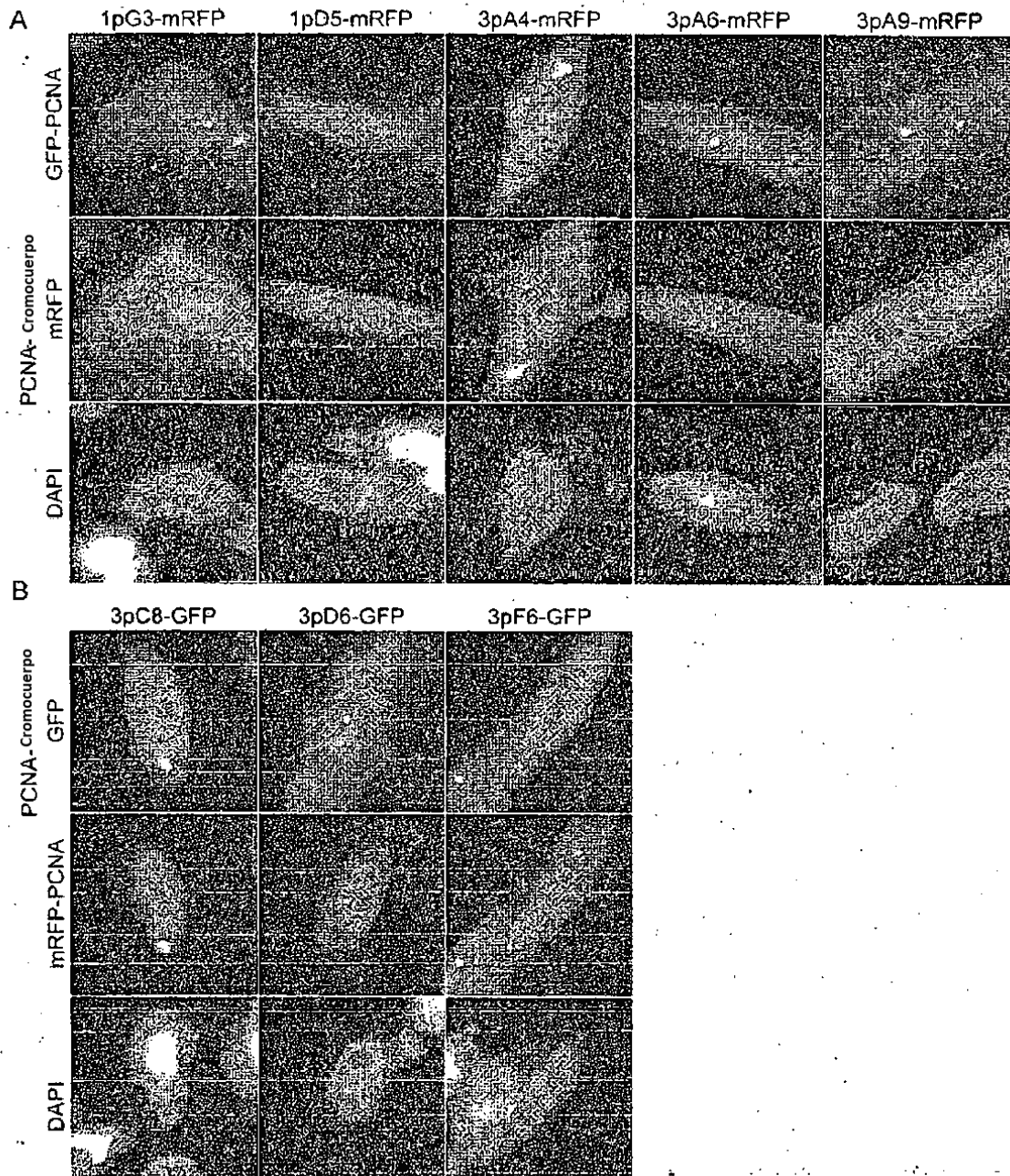
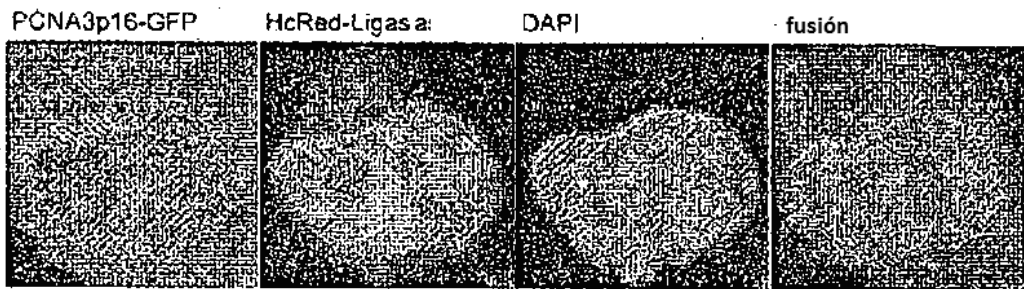
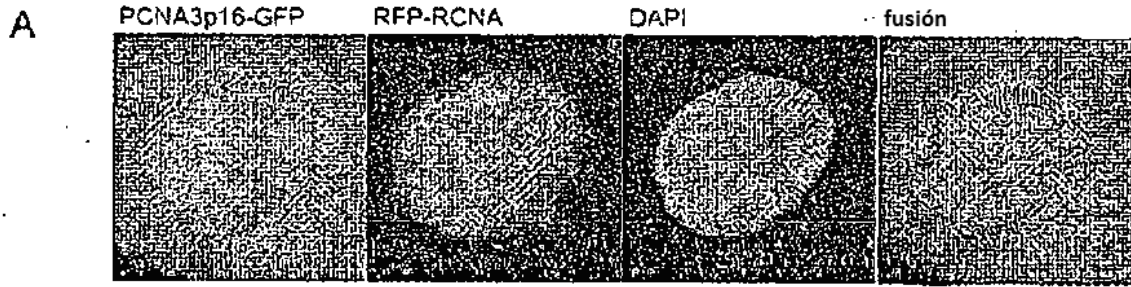


Figura 3



B

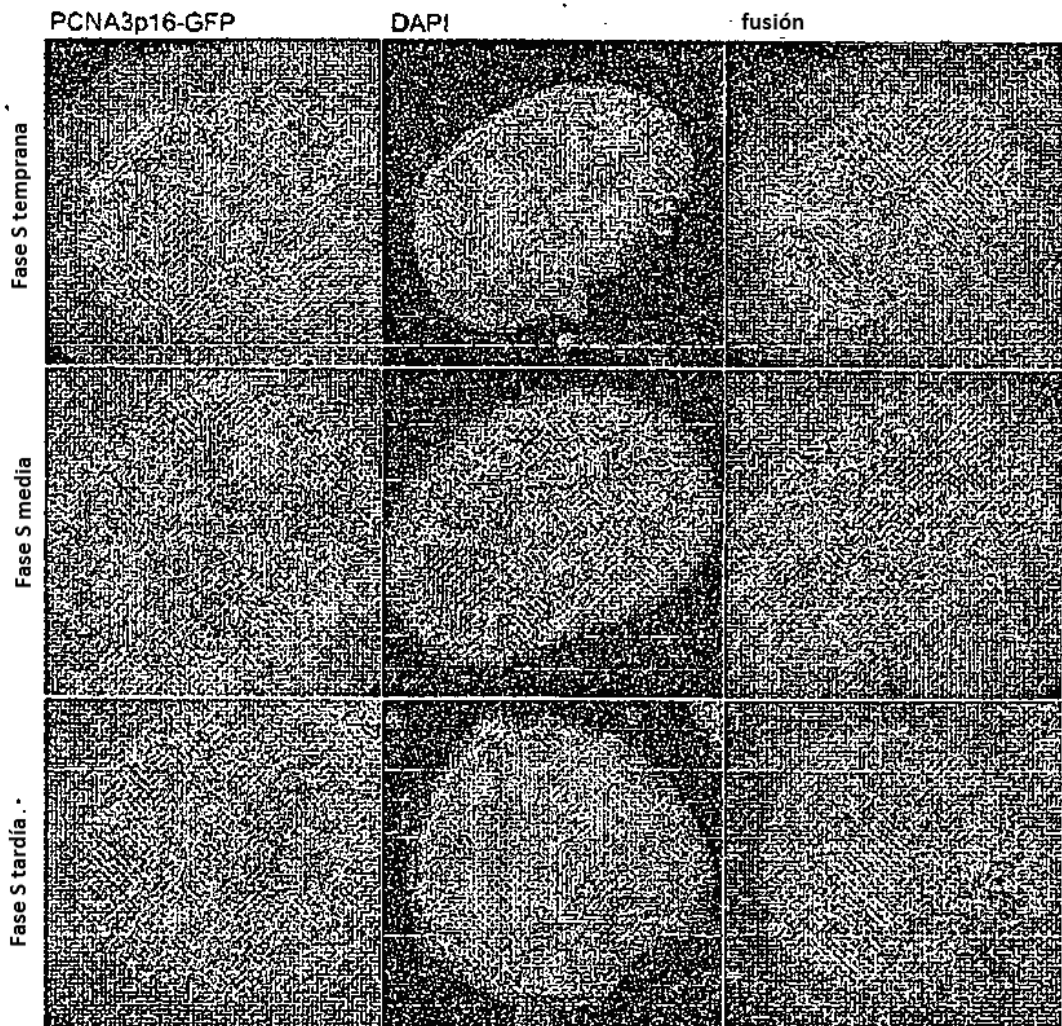


Figura 4

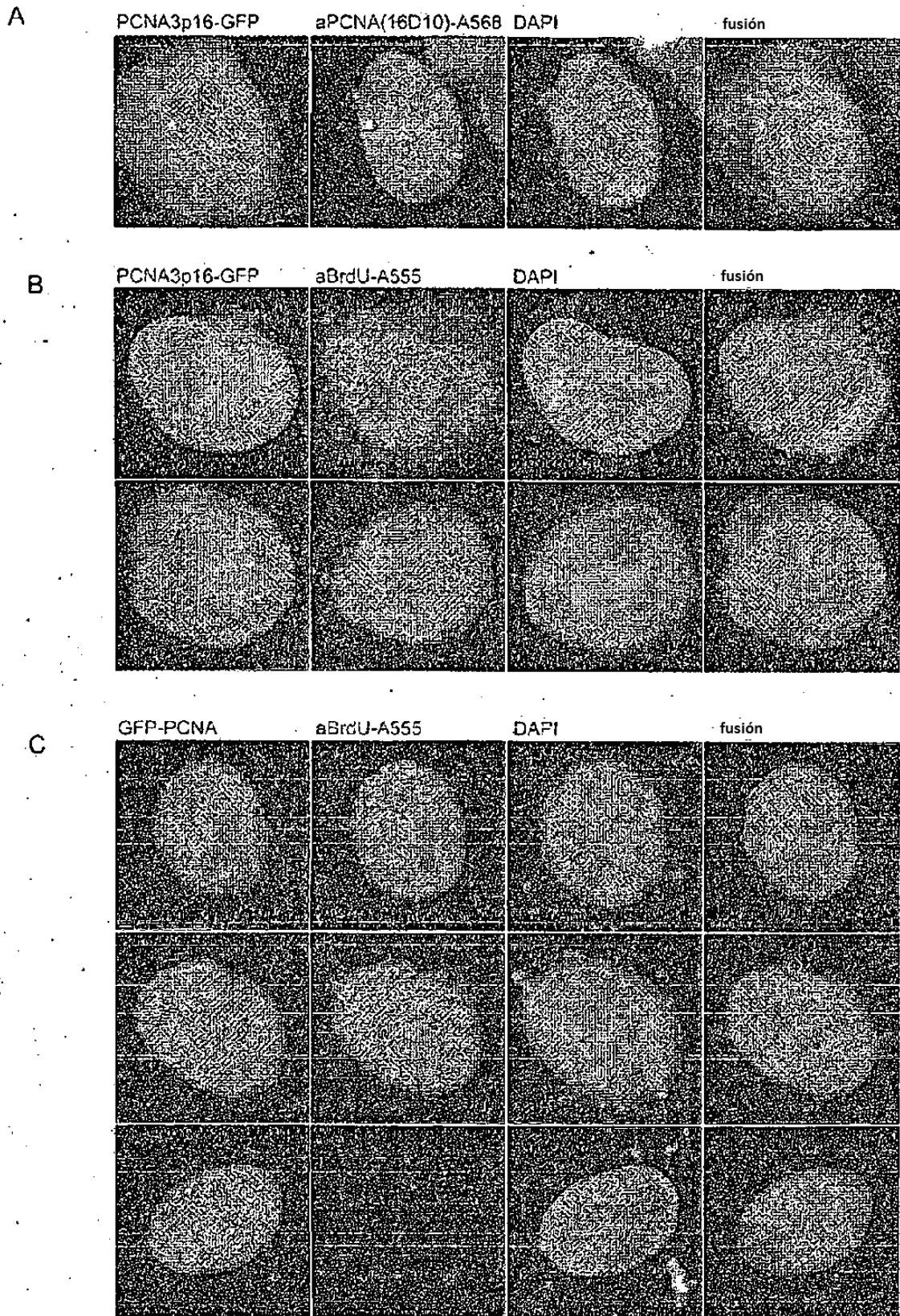


Figura 5

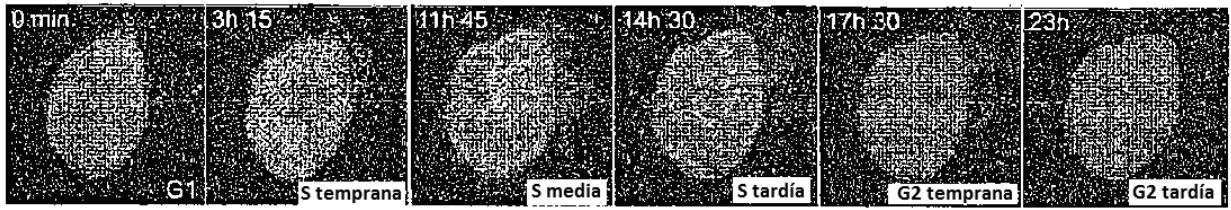


Figura 6

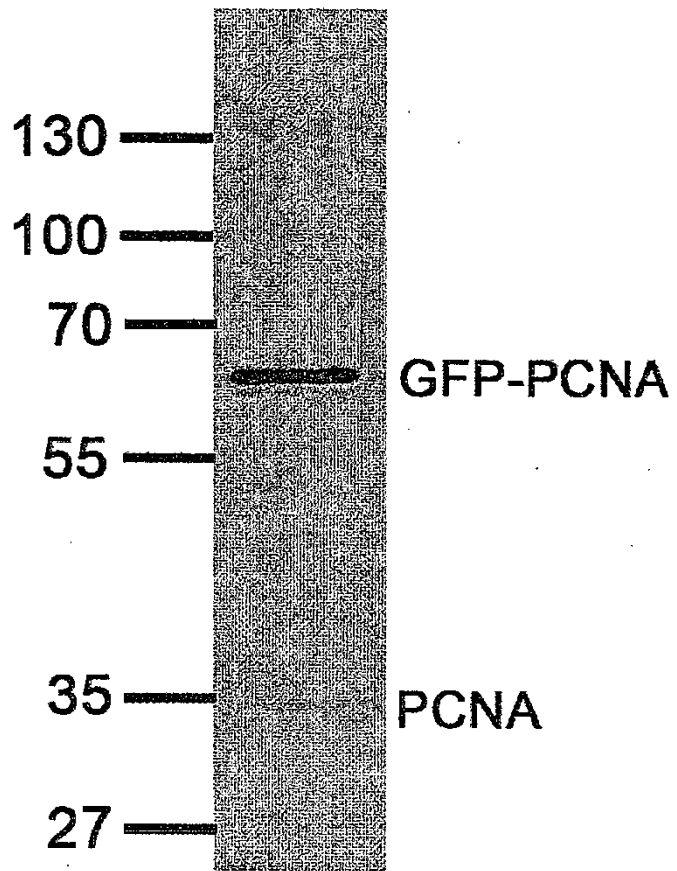
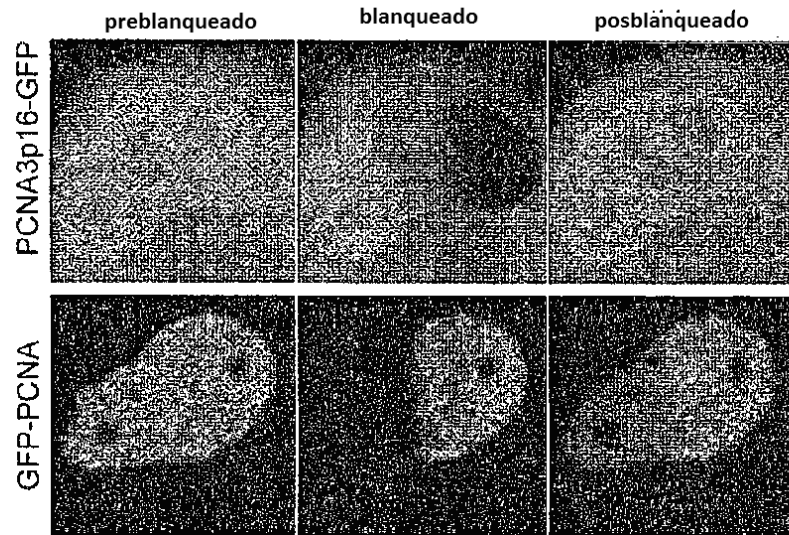


Figura 7

A



B

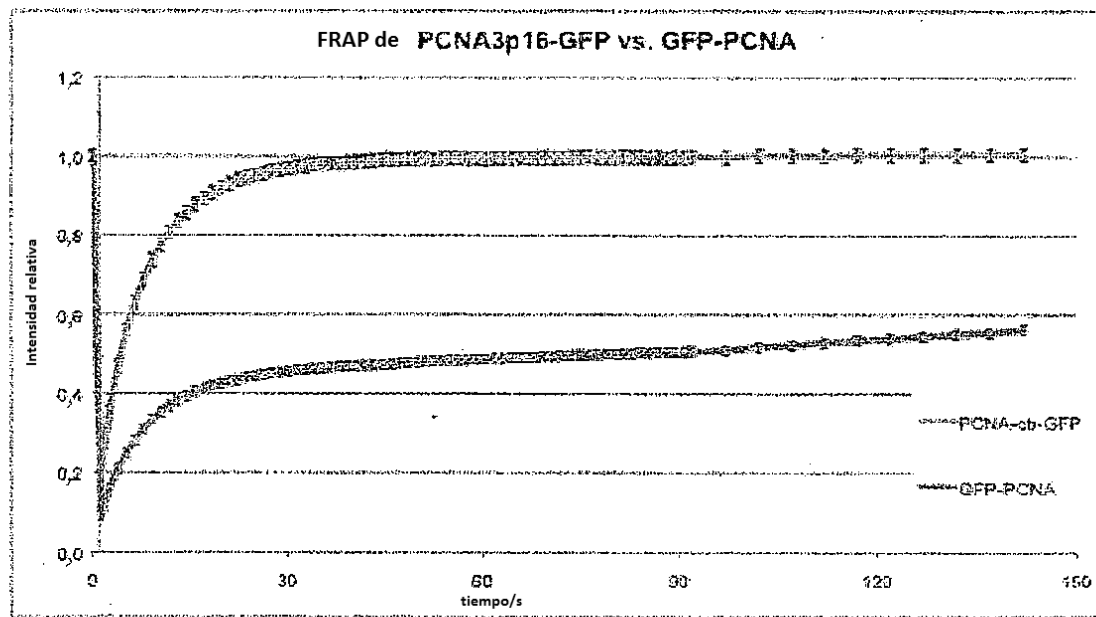


Figura 8A

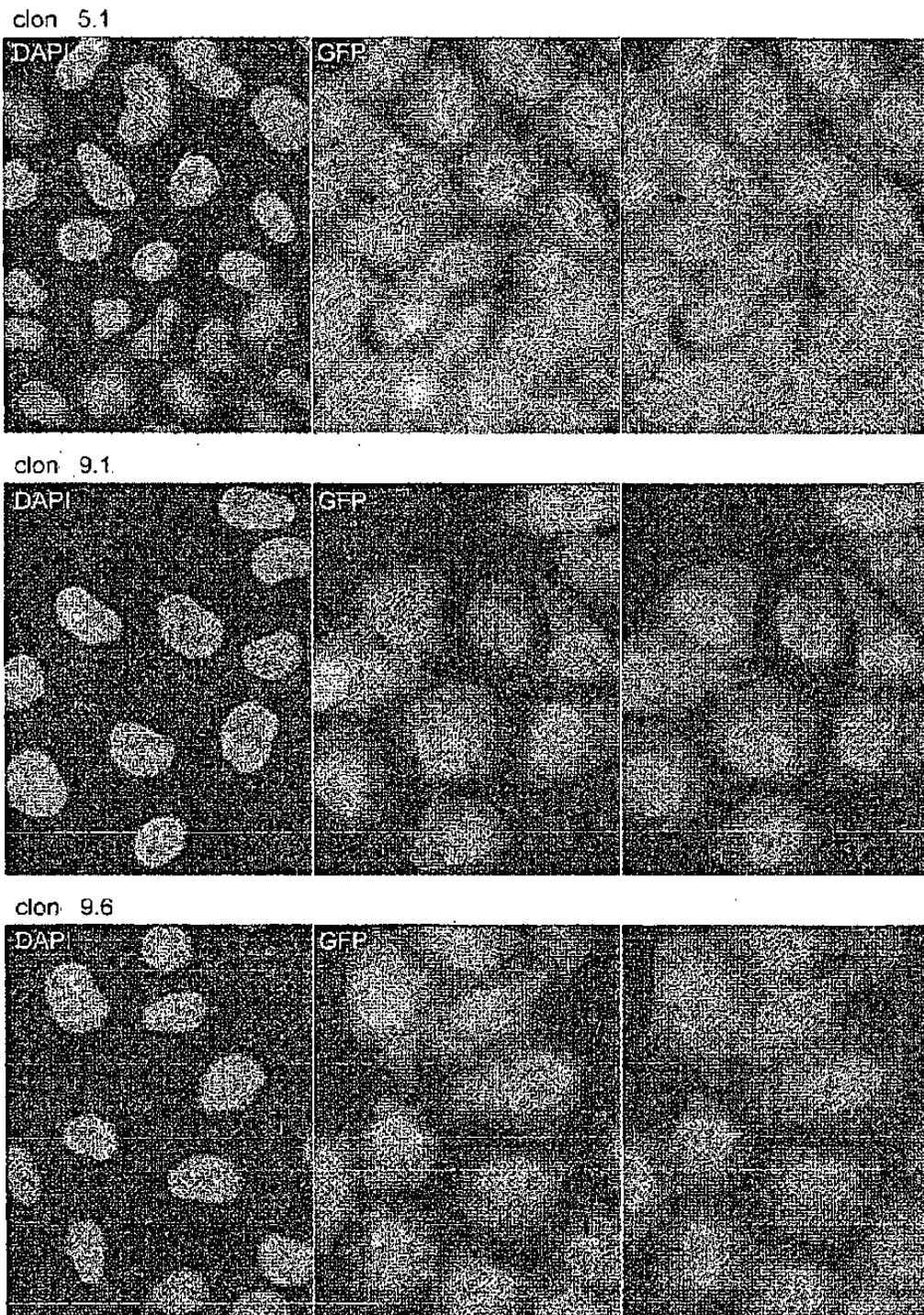


Figura 8B

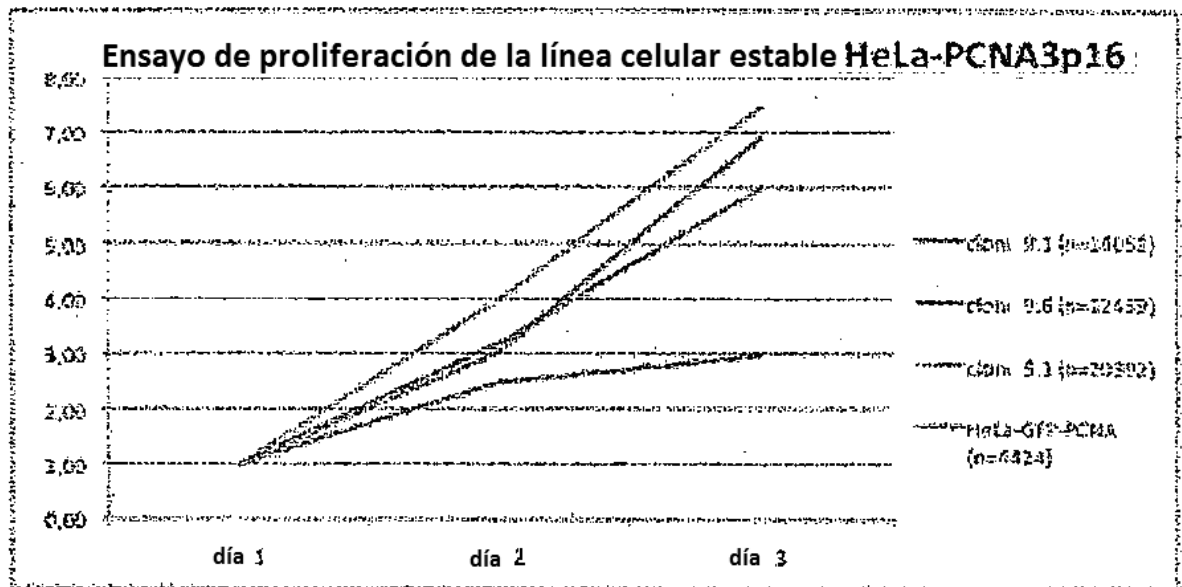


Figura 9

alineación de polipéptidos de la invención que se unen específicamente al PCNA

```

!-----FR1-----|-----FR2-----|-----FR3-----|-----FR4-----|
SEC ID : 2
MAQVQLVESGGGLYQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAEFGKGLEWVSDISFSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQSPRTRIPAPSSQGTQVTVSS
SEC ID : 16
MAQVQLVESGGGLYQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAEFGKGLEWVSDISFSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQSPRTRIPAPSSQGTQVTVSS
SEC ID : 18
MAQVQLVESGGGLYQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAEFGKGLEWVSDISFSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVKQSPRTRIPAPSSQGTQVTVSS

```


Figura 10

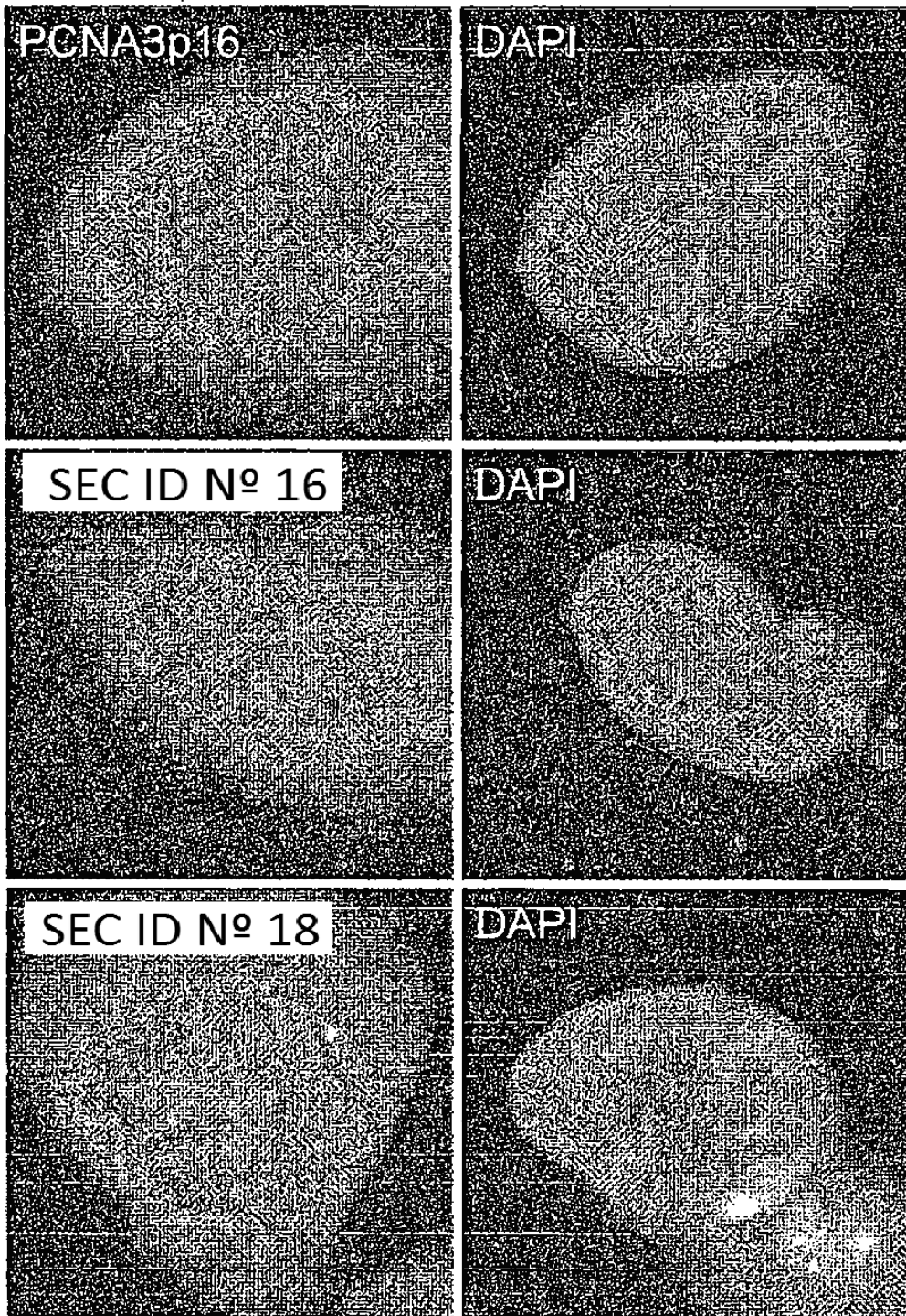


Figura 11

