

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 655**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2017 E 17191829 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **24.01.2024 EP 3456821**

54 Título: **Vectores de ADN no integrantes para la modificación genética de células**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
06.08.2024

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**HARBOTTLE, RICHARD;
BOZZA, MATTHIAS y
WILLIAMS, JAMES A.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 821 655 T5

DESCRIPCIÓN

Vectores de ADN no integrantes para la modificación genética de células

La presente divulgación se refiere a un polinucleótido que comprende al menos un promotor y un elemento S/MAR, en el que dicho elemento S/MAR está ubicado corriente abajo de dicho promotor y en el que la secuencia de ácido nucleico de dicho elemento S/MAR (secuencia S/MAR) comprende al menos 3 motivos de secuencia ATTA (SEQ ID NO:1) por 100 nucleótidos en un tramo de 200 nucleótidos como máximo; la presente divulgación se refiere además a una composición y a una célula hospedadora que comprende dicho polinucleótido y al polinucleótido para su uso en medicina y para el tratamiento de enfermedades genéticas. La presente divulgación también se refiere a un kit y a un dispositivo que comprende dicho polinucleótido, y a procedimientos y usos relacionados con el polinucleótido.

La modificación genética de células se utiliza de forma rutinaria en el cultivo celular moderno con fines científicos. Sin embargo, el uso de técnicas correspondientes en el tratamiento de enfermedades hereditarias causadas por mutaciones de genes, aunque es muy deseable, todavía se ve obstaculizado por el problema de que los procedimientos disponibles generalmente solo proporcionan modificaciones transitorias, tales como los protocolos de transfección transitoria, mientras que los procedimientos que proporcionan una modificación estable de las células generalmente se basan en la integración del transgén en el genoma de la célula hospedadora. La integración de un transgén, sin embargo, incluso si está dirigido a un locus específico, tiene el riesgo de inducir una mutación perjudicial, que puede provocar, por ejemplo, cáncer como efecto secundario del tratamiento.

Las regiones de unión de andamios/matrices (S/MAR, del inglés *Scaffold/matrix attachment regions*), que también se conocen como regiones de unión al andamio (SAR, del inglés *scaffold-attachment region*) o regiones asociadas a la matriz (MAR, del inglés *matrix-associated regions*) se conocen como secuencias en el genoma de organismos eucariotas que median la unión de la matriz nuclear. Los S/MARS son secuencias ricas en AT, y se descubrió que algunos motivos ricos en AT se enriquecieron aún más (Liebeich y col. (2002), NAR 30(15): 3433). Se ha propuesto una variedad de vectores para el mantenimiento estable en células basados en motivos S/MAR, por ejemplo, en el documento US 6.410.314 B1 y en Haase y col. (2010), BMC Biotechnology 10:20; además, se identificaron efectos epigenéticos que influyen en la replicación de dichos vectores (Haase y col. (2013), PLOS One 8(11):e79262). El documento US 5.985.607 propuso moléculas de ADN recombinante que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica eritropoyetina de mamífero (EPO) o el activador de plasminógeno tisular (tPA), una secuencia de control de la expresión unida operativamente a la misma y al menos un elemento SAR para expresar EPO o tPA recombinante de mamífero.

Existe, no obstante, una necesidad en la técnica de medios y procedimientos mejorados para la transfección estable de células, en particular, utilizando elementos S/MAR y evitando los riesgos que implica la integración del transgén en el genoma de la célula hospedadora. Este problema se resuelve por los medios y procedimientos desvelados en el presente documento.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende al menos un promotor y un elemento S/MAR según la reivindicación 1. Se desvela además un polinucleótido que comprende al menos un promotor y un elemento S/MAR, en el que dicho elemento S/MAR está ubicado corriente abajo de dicho promotor y en el que la secuencia de ácido nucleico de dicho elemento S/MAR (secuencia S/MAR) comprende al menos 3 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de 200 nucleótidos como máximo.

Tal como se usa a continuación, los términos "tiene", "comprende" o "incluye" o cualquier variación gramatical arbitraria de los mismos se usa de forma no exclusiva. Por lo tanto, ambos términos se pueden referir a una situación en la que, además de la característica introducida por estos términos, no hay más características presentes en la entidad descrita en este contexto y en una situación en la que están presentes una o más características adicionales. Como ejemplo, las expresiones "A tiene B", "A comprende B" y "A incluye B" pueden referirse a una situación en la que, además de B, ningún otro elemento está presente en A (es decir, una situación en la que A se compone única y exclusivamente de B) y en una situación en la que, además de B, uno o más elementos adicionales están presentes en la entidad A, tal como el elemento C, los elementos C y D o incluso otros elementos.

Además, tal como se usa a continuación, las expresiones "preferentemente", "más preferentemente", "lo más preferentemente", "particularmente", "más en particular", "específicamente", "más específicamente" o expresiones similares se utilizan junto con características opcionales, sin restringir más posibilidades. Por lo tanto, las características introducidas por estos términos son características opcionales y no pretenden restringir el ámbito de las reivindicaciones de ninguna manera. La invención puede, como reconocerá la persona experta, realizarse utilizando características alternativas. De forma similar, las características introducidas por "en una realización de la invención" o expresiones similares están destinadas a ser características opcionales, sin ninguna restricción con respecto a otras realizaciones de la invención, sin restricción alguna en cuanto al ámbito de la invención y sin restricción alguna en cuanto a la posibilidad de combinar las características introducidas de esta manera con otras características opcionales o no opcionales de la invención.

Además, si no se indica lo contrario, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado con la precisión técnica comúnmente aceptada en el campo correspondiente, preferentemente se refiere al valor indicado \pm el 20 %, más

preferentemente \pm el 10 %, lo más preferentemente \pm el 5 %. Además, el término "esencialmente" indica que las desviaciones que influyen en el resultado o uso indicado están ausentes, es decir, las posibles desviaciones no hacen que el resultado indicado se desvíe en más de \pm el 20 %, más preferentemente \pm el 10 %, lo más preferentemente \pm el 5 %. Por lo tanto, "consistente esencialmente en" significa que incluye los componentes especificados pero excluye otros componentes, excepto los materiales presentes como impurezas, materiales inevitables presentes como resultado de los procedimientos utilizados para proporcionar los componentes, y componentes añadidos con un fin distinto al de lograr el efecto técnico de la invención. Por ejemplo, una composición definida usando la frase "que consiste esencialmente en" abarca cualquier aditivo aceptable conocido, excipiente, diluyente, vehículo, y similares. Preferentemente, una composición que consiste esencialmente en un conjunto de componentes comprenderá menos del 5 % en peso, más preferentemente menos del 3 % en peso, incluso más preferentemente menos del 1 %, lo más preferentemente menos del 0,1 % en peso de componente(s) no especificado(s). En el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos, el término "esencialmente idéntico" indica un % de valor de identidad de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %. Tal como se entenderá, la expresión esencialmente idéntico incluye el 100 % de identidad. Lo anterior se aplica a la expresión "esencialmente complementario" mutatis mutandis.

El término "polinucleótido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico lineal o circular. El término abarca polinucleótidos monocatenarios así como parcial o completamente bicatenarios. Preferentemente, el polinucleótido es ARN o es ADN, incluido el ADNc. Además, también están comprendidos polinucleótidos modificados químicamente que incluyen polinucleótidos modificados de origen natural tales como polinucleótidos glicosilados o metilados o derivados modificados artificialmente tales como polinucleótidos biotinilados. Se proporcionará el polinucleótido de la presente invención, preferentemente, ya sea como polinucleótido aislado (es decir, aislado de su contexto natural) o en forma genéticamente modificada. El polinucleótido de la invención comprende al menos un promotor activo en una célula hospedadora y un elemento S/MAR; además, el polinucleótido tiene la actividad biológica de replicarse episomalmente en una célula hospedadora, todo tal como se especifica a continuación en el presente documento. Preferentemente, el polinucleótido tiene una longitud máxima de 1 Mb, más preferentemente como máximo 500 kb, incluso más preferentemente como máximo 200 kb, lo más preferentemente como máximo 100 kb. Preferentemente, el polinucleótido es un polinucleótido de origen no natural; por lo tanto, preferentemente, el nucleótido es un polinucleótido artificial. También preferentemente, el polinucleótido es un polinucleótido quimérico; más preferentemente, el polinucleótido comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga a las restantes secuencias de ácido nucleico que comprende.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término polinucleótido, preferentemente, incluye variantes de los polinucleótidos indicados específicamente. Más preferentemente, el término polinucleótido se refiere a los polinucleótidos específicos indicados. La expresión "variante de polinucleótido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una variante de un polinucleótido relacionado con el presente documento que comprende una secuencia de ácido nucleico caracterizada porque la secuencia puede provenir de la secuencia de ácido nucleico específica antes mencionada mediante al menos una sustitución, adición y/o delección de nucleótido, en el que la variante de polinucleótido tendrá la actividad o actividades biológicas especificadas para el polinucleótido específico. Por lo tanto, debe entenderse que una variante de polinucleótido como se menciona de acuerdo con la presente invención tendrá una secuencia de ácido nucleico que difiere debido a al menos una sustitución, delección y/o adición de nucleótido. Preferentemente, dicha variante de polinucleótido comprende un ortólogo, un parólogo u otro homólogo del polinucleótido específico o de una subsecuencia funcional del mismo, por ejemplo, de un elemento S/MAR. También preferentemente, dicha variante de polinucleótido comprende un alelo de origen natural del polinucleótido específico o de una subsecuencia funcional del mismo. Las variantes de polinucleótidos también abarcan polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridar con los polinucleótidos específicos mencionados anteriormente o subsecuencias funcionales de los mismos, preferentemente, bajo estrictas condiciones de hibridación. Estas estrictas condiciones son conocidas por el trabajador experto y se pueden encontrar en los libros de texto convencionales. Un ejemplo preferido de estrictas condiciones de hibridación son las condiciones de hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio a $6\times$ (= SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de una o más etapas de lavado en SSC a $0,2\times$, SDS al 0,1% de 50 a 65 °C. El experto en la materia sabe que estas condiciones de hibridación difieren según el tipo de ácido nucleico y, por ejemplo cuando hay disolventes orgánicos presentes, con respecto a la temperatura y concentración del tampón. Por ejemplo, en "condiciones estándar de hibridación", la temperatura difiere según el tipo de ácido nucleico entre 42 °C y 58 °C en tampón acuoso con una concentración de SSC de $0,1\times$ a $5\times$ (pH 7,2). Si hay disolvente orgánico presente en el tampón mencionado anteriormente, por ejemplo, formamida al 50 %, la temperatura en condiciones estándar es de aproximadamente 42 °C. Las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ADN son, preferentemente, por ejemplo, SSC a $0,1\times$ y 20 °C a 45 °C, preferentemente entre 30 °C y 45 °C. Las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ARN son, preferentemente, por ejemplo, SSC a $0,1\times$ y 30 °C a 55 °C, preferentemente entre 45 °C y 55 °C. Las temperaturas de hibridación mencionadas anteriormente se determinan, por ejemplo, para un ácido nucleico con aproximadamente 100 pb (= pares de bases) de longitud y un contenido de G+C del 50 % en ausencia de formamida; por consiguiente, otras condiciones más adecuadas para ADN bajo en G+C, que son en principio conocidas por el experto en la materia, pueden resultarle más apropiadas al experto en la materia. El trabajador experto sabe cómo determinar las condiciones de hibridación requeridas refiriéndose a los libros de texto convencionales. Como alternativa, las variantes de polinucleótidos se pueden obtener mediante técnicas basadas en PCR, tales como la amplificación de ADN basada en cebadores de oligonucleótidos mixtos, es decir, usando cebadores degenerados contra dominios conservados de un polipéptido de

la presente invención. Los dominios conservados de un polipéptido se pueden identificar mediante una comparación de secuencias de la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido o la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente invención con secuencias de otros organismos. Como molde, se puede usar ADN o ADNc de bacterias, hongos, plantas o, preferentemente, de animales. Además, las variantes incluyen polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que son al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idénticas a las secuencias de ácido nucleico específicamente indicadas o subsecuencias funcionales de las mismas. Además, también se incluyen polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos que son al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos específicamente indicadas. Los valores porcentuales de identidad, preferentemente, se calculan sobre toda la región de secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos. El trabajador experto dispone de una serie de programas basados en una variedad de algoritmos para comparar diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente fiables. Para realizar las alineaciones de secuencia, el programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins y col., CABIOS, 5 1989: 151-153) o los programas Gap y BestFit (Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)) y Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))), se utilizan preferentemente. Preferentemente, dichos programas se utilizan con sus parámetros estándar. Los valores de identidad de secuencia mencionados anteriormente en porcentaje (%) deben determinarse, preferentemente, usando el programa GAP en toda la región de secuencia con las siguientes configuraciones: Peso del hueco: 50, Peso de longitud: 3, Emparejamiento promedio: 10.000 y Emparejamiento incorrecto promedio: 0,000, que, a menos que se especifique otra cosa, siempre se utilizará como configuración estándar para alineaciones de secuencia.

Un polinucleótido que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico indicadas específicamente, dicho polinucleótido conservando la actividad o actividades indicadas, también se incluye como variante de polinucleótido de la presente invención. Un fragmento tal como se entiende en el presente documento, preferentemente, comprende al menos 200, preferentemente al menos 300, más preferentemente al menos 400 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico específicas; o codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 100, preferentemente al menos 200, más preferentemente al menos 300 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos específicas y que aún tengan la actividad indicada.

Los polinucleótidos de la presente invención bien consisten en, consisten esencialmente en, o comprenden, las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente. Por lo tanto, también pueden contener otras secuencias de ácido nucleico. Específicamente, los polinucleótidos de la presente invención pueden codificar, por ejemplo, proteínas de fusión o marcadores seleccionables. Tales proteínas de fusión pueden comprender como parte adicional polipéptidos para controlar la expresión (por ejemplo, proteínas fluorescentes verdes, amarillas, azules o rojas, fosfatasa alcalina y similares) o los denominados "marcadores" que pueden servir como marcador detectable o como medida auxiliar para fines de purificación. Los marcadores para los diferentes fines son bien conocidos en la técnica y se describen en otra parte del presente documento.

También preferentemente, el polinucleótido comprende al menos una secuencia de carga. La expresión "secuencia de carga", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico de interés que se transfiere y se mantiene de forma estable en una célula hospedadora. Preferentemente, la secuencia de carga es una secuencia de ácido nucleico que codifica un polinucleótido, por ejemplo, un ARN y/o un polipéptido de interés. Preferentemente, el polipéptido de interés es un polipéptido terapéutico, más preferentemente un receptor de linfocitos T (TCR), más preferentemente un receptor de linfocitos T humano o quimérico, un receptor de antígeno quimérico (CAR), preferentemente MART1 TCR, o un polipéptido que carece de células afectadas por una enfermedad genética como se especifica en otra parte del presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, preferentemente, el polinucleótido comprende al menos una secuencia de carga que codifica un polipéptido que proporciona actividad fenilalanina-hidroxilasa (EC 1.14.16.1) para el tratamiento de la fenilcetonuria.

Preferentemente, la secuencia que codifica un marcador seleccionable y la secuencia de carga están intervenidas por una secuencia que permite la expresión de dos (o más) polipéptidos en una célula eucariota a partir de un ARNm, por ejemplo, una secuencia de entrada ribosómica interna (IRES) o, más preferentemente, una secuencia de péptidos que se autoescinde como, lo más preferentemente, una secuencia del péptido 2A (P2A) del teschovirus porcino 1. Las secuencias apropiadas se conocen en la técnica, por ejemplo, de Kim y col. (2011) PLoS ONE 6(4): e18556.

Preferentemente, el polinucleótido es un ADN. Preferentemente, el polinucleótido comprende secuencias de control de expresión adicionales que permiten la expresión de genes en procariontes y/o eucariotes, preferentemente en células hospedadoras eucariotas o en fracciones aisladas de las mismas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido, preferentemente en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferentemente células de mamífero, son bien conocidos en la materia. Preferentemente, comprenden secuencias reguladoras que garantizan el inicio de la transcripción y, opcionalmente, señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización de la transcripción. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales. Ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de SMVP, U6, H1, 7SK, CMV-EFS, SV40 o RSV (virus del sarcoma de Rous), el potenciador

de CMV, el potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y otros animales. Además, las secuencias de control de expresión inducibles o específicas del tipo celular pueden estar comprendidas en un polinucleótido de la presente invención. Las secuencias de control de la expresión inducible pueden comprender secuencias del operador tet o lac o secuencias inducibles por choque térmico u otros factores ambientales. Se conocen bien en la técnica secuencias de control de la expresión adecuadas. Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio de poli-A del SV40 o el sitio de poli-A de tk, corriente abajo del polinucleótido.

La expresión "célula hospedadora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier célula capaz de recibir y replicar de forma estable el polinucleótido. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula eucariota, preferentemente una célula vegetal o de levadura, por ejemplo, una célula de una cepa de levadura de panadería, o es una célula animal. Más preferentemente, la célula hospedadora es una célula de insecto o una célula de mamífero, en particular una célula de ratón o de rata. Incluso más preferentemente, la célula hospedadora es una célula de mamífero, lo más preferentemente es una célula humana. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula progenitora CD34+; un trombocito CD61+; un linfocito B CD19+; un monocito CD14+; un granulocito CD15+; un linfocito T citotóxico CD3+, preferentemente también positivo para CD8 y CD45; un linfocito T CD3+ colaborador, preferentemente también positivo para CD4 y CD45; un linfocito T CD3+ activado, preferentemente también positivo para CD25 y CD45, un linfocito infiltrante de tumor o un linfocito citolítico natural (NK). Tal y como comprenderá el experto en la materia, el polinucleótido puede tener además secuencias que permitan la replicación en una célula bacteriana, en particular, un origen de replicación bacteriano. Preferentemente, la célula bacteriana es una célula de una cepa de bacterias de laboratorio, más preferentemente una célula de *Escherichia coli*.

El término "promotor" es, en principio, conocido por el experto como elemento genético que dirige, opcionalmente en concierto con otros elementos reguladores, el nivel de transcripción de un gen dado. Un promotor puede ser constitutivo, es decir, proporcionar un nivel constante de transcripción esencialmente independiente del estado de la célula hospedadora, o puede estar regulado, es decir, proporcionar niveles de transcripción en función del estado de la célula hospedadora. Además, un promotor puede ser de tipo celular y/o específico de tejido, es decir, proporciona un nivel detectable de transcripción solo en unos pocos o solo un tipo de célula. Preferentemente, el promotor según la presente invención es activo en la célula hospedadora tal como se especifica anteriormente en el presente documento. Tal y como comprenderá el experto en la materia, la selección del promotor puede depender del tipo de célula hospedadora destinada al direccionamiento; se conocen en la técnica promotores adecuados para tipos celulares específicos así como promotores constitutivos. Preferentemente, el promotor es un promotor eucariota, más preferentemente un promotor eucariota constitutivo, aún más un fuerte promotor eucariota. Preferentemente, el promotor es un promotor EF1alfa (factor de elongación 1 alfa), un promotor UbiC (ubiquitina C), un promotor ROSA 26, un promotor de PGK (fosfoglicerato quinasa) y/o un promotor de CAG (alfa-actina de pollo), más preferentemente es un promotor EF1 alfa. También preferentemente, el promotor es un promotor eucariótico específico de células y/o tejidos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "promotor" se usa para el promotor como se especificó anteriormente, mientras que cualquier otro promotor potencialmente presente en el polinucleótido además se denomina "promotor secundario". Por lo tanto, preferentemente, el promotor es un promotor que dirige la transcripción en la secuencia S/MAR en una célula hospedadora; también preferentemente, un promotor que no dirige la transcripción en la secuencia S/MAR del polinucleótido, por ejemplo, por ser un promotor procarionta, por estar aislado transcripcionalmente de la secuencia S/MAR, y/o por ser un promotor que dirige la transcripción lejos de la secuencia S/MAR, es un promotor secundario. Preferentemente, el promotor comprende menos de 1000, más preferentemente menos de 250, incluso más preferentemente menos de 100, lo más preferentemente menos de 20 pares de bases contiguas correspondientes a un promotor de apolipoproteína B; por lo tanto, preferentemente, el polinucleótido no comprende un promotor de apolipoproteína B humana, más preferentemente no comprende un promotor de apolipoproteína B.

Preferentemente, la secuencia S/MAR se encuentra inmediatamente corriente abajo del promotor y, si está presente, del gen marcador seleccionable tal como se especifica a continuación en el presente documento. Preferentemente, estar ubicado "inmediatamente corriente abajo" carece de una señal de terminación de la transcripción intermedia, más preferentemente carece de un gen intermedio. Por lo tanto, preferentemente, los transcritos iniciados en el promotor y, si están codificados, incluida la secuencia del marcador detectable, comprenden preferentemente una secuencia S/MAR transcrita, más preferentemente comprenden la secuencia S/MAR completa comprendida en el polinucleótido; como entenderá el experto a la vista de la descripción en otra parte del presente documento, el polinucleótido puede incluir además sitios de corte y empalme que median la escisión de la secuencia S/MAR del transcrito primario; por lo tanto, más preferentemente, preferentemente, al menos los transcritos iniciados en el promotor y, si están codificados, incluida la secuencia del marcador detectable, comprenden preferentemente una secuencia S/MAR transcrita, más preferentemente comprenden la secuencia S/MAR completa comprendida en el polinucleótido. También preferentemente, la expresión "inmediatamente corriente abajo" incluye un polinucleótido en el que el promotor y la secuencia S/MAR están separados por secuencias de ácido nucleico alargadas, siempre que una señal de terminación de la transcripción no esté entre el promotor y el S/MAR. Preferentemente, la secuencia que está entre medias del promotor o, si está presente, el codón de parada del gen marcador seleccionable y la secuencia S/MAR tiene una longitud de 2 kb como máximo, más preferentemente como máximo 0,5 kb, incluso más preferentemente como máximo 0,2 kb, aún más preferentemente como máximo 0,1 kb, lo más preferentemente como máximo 50 pb.

La expresión "elemento S/MAR", también conocida con la designación "región de unión de andamiaje/matriz", es, en principio, conocida por el experto en la materia para referirse a una secuencia de ADN que media la unión de la matriz nuclear de una célula eucariota a dicho ADN. Las secuencias S/MAR normalmente se obtienen de secuencias en el ADN de cromosomas eucariotas. Hay disponible una variedad de secuencias S/MAR, y las secuencias están disponibles en bases de datos públicas, por ejemplo, tal como se describe en Liebich y col. (2002), Nucleic Acids Res. 30, 312-374. De acuerdo con la presente invención, la secuencia de ácido nucleico de dicho elemento S/MAR (hasta ahora denominada secuencia S/MAR) comprende al menos 3 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 200 nucleótidos. Por lo tanto, el motivo comprendido en la secuencia S/MAR comprende una multitud del motivo de cuatro nucleótidos 5'-ATTA-3'. Preferentemente, la secuencia S/MAR tiene una longitud de al menos 200 nucleótidos, más preferentemente al menos 300 nucleótidos, incluso más preferentemente al menos 400 nucleótidos, lo más preferentemente al menos 500 nucleótidos. Preferentemente, la secuencia S/MAR tiene una longitud máxima de 3 kb, más preferentemente como máximo 2 kb, incluso más preferentemente como máximo 1,5 kb, aún más preferentemente como máximo 1 kb, lo más preferentemente como máximo 0,9 kb. Por lo tanto, preferentemente, la secuencia S/MAR tiene una longitud de 0,2 kb a 3 kb, más preferentemente de 0,3 kb a 2 kb, incluso más preferentemente de 0,4 kb a 1,5 kb, lo más preferentemente de 0,5 kb a 1 kb. Tal como se entenderá, la indicación "comprende n motivos de secuencia por 100 nucleótidos" se refiere al número medio de dichos motivos de secuencia calculado por 100 pares de bases de secuencia y, por consiguiente, puede ser un número de fracción. Por ejemplo, el número de motivos de secuencia ATTA por 100 pares de bases en la SEQ ID NO:6 es $34 / 525$ pares de bases * 100 pares de bases = 6,5. Preferentemente, el número de motivos de secuencia por 100 pares de bases se determina en toda la longitud de la secuencia S/MAR; en caso de duda, por ejemplo, cuando no se puede determinar un límite de la secuencia S/MAR, el número de motivos de secuencia por 100 pares de bases de un polinucleótido, preferentemente, es el número más alto determinable para cualquier ventana de 200 pb dentro de dicho polinucleótido, más preferentemente es el número más alto determinable para cualquier ventana de 500 pb dentro de dicho polinucleótido. Preferentemente, la secuencia S/MAR comprende al menos 4 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de 200 nucleótidos como máximo, más preferentemente al menos 5 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 200 nucleótidos, aún más preferentemente al menos 6 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 200 nucleótidos. También preferentemente, la secuencia S/MAR comprende al menos 3 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de 400 nucleótidos como máximo, más preferentemente al menos 4 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 400 nucleótidos, incluso más preferentemente al menos 5 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 400 nucleótidos, lo más preferentemente al menos 6 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 400 nucleótidos. También preferentemente, la secuencia S/MAR comprende al menos 3 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de 500 nucleótidos como máximo, más preferentemente al menos 4 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 500 nucleótidos, aún más preferentemente al menos 5 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 500 nucleótidos, lo más preferentemente al menos 6 motivos de secuencia ATTA por 100 nucleótidos en un tramo de como máximo 500 nucleótidos. Por lo tanto, preferentemente, la secuencia S/MAR comprende al menos 10 motivos de secuencia ATTA sobre una secuencia de 500 nucleótidos, más preferentemente al menos 20 motivos de secuencia ATTA sobre una secuencia de 500 nucleótidos, aún más preferentemente al menos 30 motivos de secuencia ATTA sobre una secuencia de 500 nucleótidos. Preferentemente, al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, lo más preferentemente al menos el 95 % de los motivos ATTA en la secuencia S/MAR están separados por de 9 a 13, preferentemente de 10 a 12, lo más preferentemente por 11 pares de bases, respectivamente.

El elemento S/MAR comprende motivos de secuencia adicionales dentro de la secuencia que comprende los motivos ATTA descritos anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el tramo de secuencia de dicho elemento S/MAR que comprende dichos motivos de secuencia ATTA comprende además al menos un motivo de secuencia ATTTA (SEQ ID NO:2), preferentemente al menos 2 motivos de secuencia ATTTA, más preferentemente al menos 4 motivos de secuencia ATTTA, lo más preferentemente al menos 8 motivos de secuencia ATTTA. El tramo de secuencia de dicho elemento S/MAR que comprende dichos motivos de secuencia ATTA y, opcionalmente, dicho(s) motivo(s) ATTTA, comprende además al menos un motivo TAAATATTTTA (SEQ ID NO:3), preferentemente dicho tramo de secuencia comprende al menos dos, más preferentemente al menos cuatro, lo más preferentemente al menos seis motivos palindrómicos, preferentemente motivos TAAATATTTTA (SEQ ID NO:3). Preferentemente, dichos motivos TAAATATTTTA son contiguos con al menos un motivo ATTA en el extremo 5' y/o el extremo 3'. También preferentemente, el tramo de secuencia del elemento S/MAR que comprende dichos motivos de secuencia ATTA comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, más preferentemente al menos tres, incluso más preferentemente al menos cuatro, lo más preferentemente al menos cinco motivos de secuencia ATTATAAATATTTTAATTA (SEQ ID NO:4), más preferentemente motivos de secuencia ATTTAATTATAAATATTTTAATTA (SEQ ID NO:5).

También preferentemente, la secuencia S/MAR tiene un contenido bajo en G+C. El experto en la materia sabe cómo calcular el contenido en C+G de una secuencia conocida contando todas las bases de guanina y citidina en la secuencia y dividiendo el resultado acumulado entre el número de nucleótidos en la secuencia. Preferentemente, el tramo de secuencia del elemento S/MAR que comprende dichos motivos de secuencia ATTA tiene un contenido en G+C de como máximo el 30 %, más preferentemente como máximo el 20 %, aún más preferentemente como máximo el 15 %, incluso más preferentemente como máximo el 10 %, lo más preferentemente como máximo el 5 %.

Preferentemente, en los casos en los que no se pueda determinar el límite de un elemento S/MAR, la secuencia utilizada para el cálculo del contenido en G+C es la misma que se utiliza para calcular el número de motivos ATTA por 100 pares de bases, tal como se especifica anteriormente en el presente documento. También preferentemente, la secuencia S/MAR tiene un número bajo de dinucleótidos CG. Preferentemente, el tramo de secuencia de dicho elemento S/MAR que comprende dichos motivos de secuencia comprende como máximo 6 motivos de secuencia CG, más preferentemente como máximo 4, incluso más preferentemente como máximo 2, lo más preferentemente no comprende un motivo de secuencia CG.

Preferentemente, la secuencia S/MAR comprende una secuencia S/MAR de un gen de la apolipoproteína B, preferentemente un gen de apolipoproteína B humana, más preferentemente una secuencia S/MAR en 3' de un gen de apolipoproteína B humana. Más preferentemente, la secuencia S/MAR comprende una variante de un gen de la apolipoproteína B humana, más preferentemente de una secuencia S/MAR en 3' de un gen de apolipoproteína B humana. Por lo tanto, preferentemente, la secuencia S/MAR comprende una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:6, preferentemente de la SEQ ID NO:7 u 8. Más preferentemente, la secuencia S/MAR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:6, preferentemente de la SEQ ID NO:7, más preferentemente de la SEQ ID NO:8.

Preferentemente, el polinucleótido comprende una señal de poli-A corriente abajo del elemento S/MAR: Más preferentemente, el polinucleótido comprende una señal de poli-A y una señal de terminación de la transcripción corriente abajo del elemento S/MAR. También preferentemente, el elemento S/MAR está flanqueado por un donante de corte y empalme y un aceptor de corte y empalme; por lo tanto, preferentemente, la secuencia S/MAR preferentemente se corta y empalma del transcrito que codifica el marcador seleccionable después de la transcripción. También preferentemente, el polinucleótido comprende además un origen de replicación bacteriano (secundario) tal como se especifica en el presente documento anteriormente y/o un gen marcador bacteriano seleccionable. Preferentemente, el origen de replicación bacteriano y el promotor que dirige la expresión del gen marcador seleccionable bacteriano son específicos de procariontes, es decir, más preferentemente, no son funcionales en una célula hospedadora. También preferentemente, el origen de replicación bacteriano y/o el gen marcador seleccionable bacteriano, preferentemente todos los elementos activos en una célula procarionte comprendidos en el polinucleótido, está/están aislados de las secuencias residuales comprendidas en el polinucleótido por la presencia de al menos un elemento aislante, más preferentemente estando flanqueados por elementos aislantes. Preferentemente, el origen de replicación bacteriano y/o el gen marcador seleccionable bacteriano, preferentemente todos los elementos activos en una célula procarionte, está/están aislados de las secuencias residuales comprendidas en el polinucleótido por la presencia de al menos un elemento aislante en el extremo 5' y de al menos un elemento aislante en el extremo 3'. Más preferentemente, el origen de replicación bacteriano y/o el gen marcador seleccionable bacteriano, preferentemente todos los elementos activos en una célula procarionte comprendidos en el polinucleótido, está/están aislados del promotor por la presencia de al menos un elemento de aislamiento, más preferentemente estando flanqueados por elementos aislantes. Preferentemente, dicho(s) elemento(s) de aislamiento es(son) un elemento anti-represivo 40 (SEQ ID NO: 11) o una variante del mismo y/o un elemento S/MAR.

Por lo tanto, preferentemente, el polinucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO:7 u 8 o de una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:7 u 8; preferentemente de la SEQ ID NO:12 o de una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 12, más preferentemente de la SEQ ID NO:13 o de una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:13, lo más preferentemente de la SEQ ID NO:14 o de una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 14. Preferentemente, el polinucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 14 con la secuencia de ácido nucleico que codifica la GFP reemplazada por una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido diferente, preferentemente un polipéptido terapéutico, más preferentemente receptor de linfocito T humano (TCR), receptor de antígeno quimérico (CAR), preferentemente MARTI TCR.

Preferentemente, el polinucleótido comprende además una secuencia codificante que codifica un polipéptido marcador seleccionable, dicha secuencia del marcador seleccionable está entre el promotor del polinucleótido y el elemento S/MAR del polinucleótido, preferentemente en la que dicho promotor y dicha secuencia del marcador seleccionable juntos constituyen un gen marcador seleccionable. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia del marcador seleccionable" se usa como una forma abreviada de la expresión "secuencia codificante que codifica un polipéptido marcador seleccionable". El término "marcador seleccionable" es entendido en principio por el experto y se refiere a una secuencia de ácido nucleico que confiere, cuando se expresa en una célula hospedadora, resistencia a al menos una condición que media la presión selectiva sobre una célula hospedadora cuando se aplica a la misma. Se conocen en la técnica marcadores seleccionables para células procariontes y eucariotas. Preferentemente, el marcador seleccionable es un marcador seleccionable de una célula eucariota. Preferentemente, el marcador seleccionable es un polipéptido marcador seleccionable, más preferentemente un polipéptido marcador seleccionable que tiene actividad transportadora y/o enzimática que elimina un compuesto selectivo de una célula caliente o modifica dicho compuesto selectivo para hacerlo inactivo. Preferentemente, el gen marcador seleccionable codifica además al menos un intrón, preferentemente corriente arriba de la secuencia que codifica el polipéptido marcador seleccionable. Preferentemente, el marcador seleccionable es un marcador que media la resistencia a la puomicina, a la blasticidina, neomicina y/o zeocina, más preferentemente a puomicina. Por lo tanto, preferentemente, el promotor y el marcador seleccionable juntos constituyen un gen de resistencia a puomicina, un gen de resistencia a blasticidina, un gen de resistencia a la neomicina o un gen de resistencia a la zeocina, más preferentemente un gen

de resistencia a puromicina. Preferentemente, el gen marcador seleccionable está desprovisto de una señal de poli-A y de señal(es) de terminación de la transcripción.

Preferentemente, el marcador seleccionable es la puromicina acetiltransferasa (N.º de referencia de Genbank KX548903.1 (SEQ ID NO: 9), codificado por los nucleótidos 535 a 1134 del N.º de referencia de Genbank KX548903.1 (SEQ ID NO:10)). Por lo tanto, el gen marcador seleccionable, preferentemente, comprende una secuencia de ácido nucleico que a) provoca la expresión de un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9; b) provoca la expresión de un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:9; c) comprende la secuencia de la SEQ ID NO:10; d) comprende una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:10; e) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende, que consiste preferentemente en, la secuencia de la SEQ ID NO:9, y/o f) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende, que consiste preferentemente en, una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:9.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "replicar" se refiere a la actividad del polinucleótido para inducir la producción de al menos dos réplicas de dicho polinucleótido en una célula hospedadora durante un ciclo de replicación celular. Por lo tanto, preferentemente, la replicación de un polinucleótido en una célula hospedadora se determina determinando la presencia del polinucleótido después de una serie de divisiones celulares, en las que se hubiera esperado que un polinucleótido no replicante se diluyera. Preferentemente, la replicación es una replicación estable, es decir, la replicación es de tal grado que el polinucleótido todavía es detectable en una población de células hospedadoras después de una media de 50 divisiones celulares, más preferentemente después de un promedio de 100 divisiones celulares, lo más preferentemente después de una media de 250 divisiones celulares. Preferentemente, la detección de un polinucleótido en una población de células hospedadoras se realiza mediante PCR en condiciones estándar.

El término replicación "episomal" es, en principio, conocido por el experto para referirse a la replicación de un polinucleótido sin estar integrado en el genoma celular, es decir, sin unirse covalentemente al genoma celular. Por lo tanto, preferentemente, la replicación episomal de un polinucleótido es la replicación de dicho polinucleótido como una unidad de replicación autónoma. Preferentemente, la replicación episomal es el mantenimiento del polinucleótido en la célula hospedadora en forma de una molécula de ADN de doble cadena cerrada circularmente. Tal y como comprenderá el experto en la materia, la replicación real de dicho polinucleótido puede involucrar otras formas, por ejemplo, en la replicación del círculo rodante. El mantenimiento episómico del ADN circular se verifica preferentemente mediante el procedimiento de rescate de plásmidos conocido por el experto; es decir, preferentemente, preparando un lisado de células hospedadoras y transformando el ADN que contiene en células bacterianas apropiadas, por ejemplo, células de *E. coli*; si un número adecuado de colonias bacterianas obtenibles mediante dicho procedimiento comprende el ADN circular como un plásmido que tiene el mismo patrón de restricción y/o secuencia que el ADN circular original, preferentemente, se asume que el ADN circular se mantuvo episomalmente. Otro procedimiento para verificar el mantenimiento episomal, que también es conocido por el experto en la materia, es la transferencia de ADN/ADN (procedimiento de "análisis por transferencia de Southern"); por lo tanto, preferentemente, el ADN total de las células hospedadoras se prepara y se digiere con una o más enzimas de restricción; si en un análisis por transferencia de Southern utilizando el plásmido original como sonda solo son visibles las bandas correspondientes al ADN circular original, preferentemente se concluye que el plásmido se mantiene episomalmente. Más preferentemente, el mantenimiento episomal se verifica como se describe en el presente documento en los Ejemplos.

De acuerdo, la expresión "replicación episomalmente", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la actividad de un polinucleótido para inducir la producción de al menos dos réplicas de dicho polinucleótido en una célula hospedadora durante un ciclo de replicación celular mientras dicho polinucleótido está presente en dicha célula como una entidad de replicación autónoma; y la replicación episomal estable es la replicación episomal hasta tal punto que el polinucleótido todavía es detectable en la célula hospedadora después de al menos 50 divisiones celulares, preferentemente después de al menos 100 divisiones celulares, más preferentemente, después de al menos 250 divisiones celulares, lo más preferentemente, después de al menos 500 divisiones celulares. Preferentemente, el número antes mencionado de divisiones de células es el número medio de divisiones de células para una población de células.

El polinucleótido de la presente invención preferentemente carece de un origen de replicación de un virus de simio 40 (SV40), un origen de replicación del virus del papiloma bovino (BPV) y un origen de replicación del virus de Epstein-Barr (EBV), preferentemente carece de un origen de replicación de poliomavirus, un origen de replicación del virus del papiloma y un origen de replicación del virus del herpes; más preferentemente carece de un origen de replicación de un virus que infecta eucariotas. Más preferentemente, el vector carece de cualquier origen de replicación eucariota conocido. Sin embargo, preferentemente, el polinucleótido comprende además un origen de replicación procariota, preferentemente bacteriano, en particular un origen de replicación de *E. coli*. Preferentemente, el origen de replicación procariota es el único origen de replicación comprendido en el polinucleótido.

Ventajosamente, se descubrió en el trabajo subyacente a la presente invención que al combinar un elemento S/MAR como se especifica con una lectura del promotor en dicho elemento S/MAR, se obtiene un polinucleótido altamente estable en forma episomal en las células hospedadoras, incluso en ausencia de un origen de replicación dedicado.

Además, se descubrió que la eficacia del establecimiento del polinucleótido podría mejorarse aún más mediante el uso de un gen de resistencia a la puromicina, asegurando la transcripción en el elemento S/MAR a través del gen de resistencia, y aislando transcripcionalmente la combinación promotor - S/MAR de otros promotores potencialmente presentes en el polinucleótido.

- 5 Las definiciones hechas anteriormente se aplican mutatis mutandis a lo siguiente. Las definiciones y explicaciones adicionales hechas más adelante también se aplican a todas las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva mutatis mutandis.

La presente invención se refiere además a una composición según la reivindicación 9; también se desvela una composición que comprende un polinucleótido según la presente invención.

- 10 El término "composición", tal como se utiliza en el presente documento, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición de materia que comprende los compuestos especificados y opcionalmente uno o más vehículos aceptables. Preferentemente, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable; por lo tanto, preferentemente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de la presente invención pueden ser formulados preferentemente como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales preferidas
15 comprenden acetato, metiléster, HCl, sulfato, cloruro y similares.

- El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y que no son deletéreos para el receptor de los mismos. Un vehículo empleado puede ser, por ejemplo, ya sea un sólido, un gel o un líquido. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los ejemplos de
20 vehículos líquidos son la solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite tal como aceite de cacahuete y aceite de oliva, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares. De forma similar, el vehículo o diluyente puede incluir material de retardo de tiempo bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera. Dichos vehículos adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack
25 Publishing Company, Easton, Pensilvania. El(los) diluyente(s) se selecciona(n) de manera que no afecten a la actividad biológica de los compuestos en la composición. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

- 30 Preferentemente, la composición media la entrada del polinucleótido en una célula hospedadora. Por lo tanto, preferentemente, la composición comprende al menos un agente de transfección. La selección de un agente de transfección apropiado puede depender de la célula hospedadora diana, así como la aplicación específica prevista. Los agentes de transfección, las condiciones de transfección adecuadas, así como los criterios de selección para los mismos son bien conocidos en la técnica. También preferentemente, la composición comprende partículas similares
35 a virus. Por lo tanto, preferentemente, el polinucleótido se empaqueta en partículas similares a virus, es decir, preferentemente, el polinucleótido está contenido en partículas similares a virus.

- Las composiciones farmacéuticas, preferentemente, se administran por vía tópica o sistémica. Las vías de administración adecuadas utilizadas convencionalmente para la administración de fármacos son la administración oral, intravenosa o parenteral así como la inhalación. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y del modo de acción de
40 un compuesto, las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por otras vías. Por ejemplo, los compuestos polinucleotídicos se pueden administrar en un enfoque de terapia génica usando vectores víricos o virus o liposomas, tal como se especifica anteriormente en el presente documento. Además, los compuestos se pueden administrar en combinación con otros fármacos en una composición farmacéutica común o como composiciones farmacéuticas separadas en las que dichas composiciones farmacéuticas separadas se pueden proporcionar en forma de un kit de partes. Los compuestos, preferentemente, se administran en formas de dosificación convencionales preparadas combinando los fármacos con vehículos farmacéuticos estándar de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable vienen dictados por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía
50 de administración y otras variables bien conocidas.

- Una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica se refiere a una cantidad de los compuestos que se utilizará en una composición farmacéutica de la presente invención que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o afección a la que se hace referencia en la presente memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción, DL50/DE50.
55

El régimen de dosificación será determinado por el médico a cargo y otros factores clínicos; preferentemente de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Como es bien sabido en las técnicas médicas,

las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluidos la talla del paciente, el área superficial del cuerpo, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente. El progreso se puede monitorear mediante evaluaciones periódicas. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores antes mencionados. En general, el régimen como una administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso se puede monitorear mediante evaluaciones periódicas. Sin embargo, dependiendo del sujeto y del modo de administración, la cantidad de sustancia administrada puede variar en un amplio intervalo para proporcionar desde aproximadamente 0,01 mg por kg de masa corporal hasta aproximadamente 10 mg por kg de masa corporal. En caso de un vector vírico, en particular se administra un vector vírico adenoasociado, las dosis preferidas son de 5×10^{11} hasta 2×10^{13} partículas víricas o genomas víricos/kg de peso corporal; tal como se entenderá, estas dosis ejemplares se pueden modificar dependiendo, además de los factores descritos anteriormente, de factores adicionales tales como el tipo de virus, el órgano diana y similares.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas a las que se hace referencia en el presente documento se administran al menos una vez para tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o afección indicada en la presente memoria descriptiva. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar más de una vez, por ejemplo, de una a cuatro veces al día hasta un número ilimitado de días.

Las composiciones farmacéuticas específicas se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo al que se hace referencia en el presente documento anteriormente mezclado o asociado de otro modo con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para hacer esas composiciones farmacéuticas específicas, el(los) compuesto(s) activo(s) normalmente se mezclarán con un vehículo o el diluyente, o se incluirán o encapsularán en una cápsula, bolsita, oblea, papel u otros recipientes o vehículos adecuados. Las formulaciones resultantes se deben adaptar al modo de administración, es decir, en forma de comprimidos, cápsulas, supositorios, soluciones, suspensiones o similares. Las recomendaciones posológicas se indicarán en las instrucciones para los prescriptores o usuarios para anticipar ajustes de dosis dependiendo del receptor considerado.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para su uso en medicina según la reivindicación 11. La presente invención se refiere además a un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para su uso en el tratamiento de una enfermedad genética según la reivindicación 11.

El término "enfermedad genética", tal como se utiliza en el presente documento, se relaciona con una enfermedad relacionada causalmente con una o más modificaciones, preferentemente mutaciones, en el genoma de un individuo. Por lo tanto, preferentemente, la enfermedad genética está relacionada causalmente con uno o más cambios epigenéticos, más preferentemente está vinculado causalmente a una o más mutaciones genéticas. Tal como se entenderá, los síntomas de una enfermedad genética a menudo son causados por la expresión de un gen mutado y/o la falta de expresión de un gen que proporciona la función normal del producto génico en uno o más tejidos específicos y/o tipos de células. Por lo tanto, puede ser preferible tratar la enfermedad genética solo en aquellas células en las que la mutación contribuye a la enfermedad. Preferentemente, la enfermedad genética es una enfermedad monogénica, es decir, es causado por una alteración genética en un gen. Más preferentemente, la enfermedad genética es una enfermedad monogénica recesiva, es decir, está provocada por alteraciones genéticas en ambos alelos de un gen; por lo tanto, preferentemente, se espera la mejora de los síntomas mediante la provisión de al menos una copia inalterada del gen afectado. Lo más preferentemente, la enfermedad genética es fenilcetonuria, alcaptonuria, amaurosis congénita de Leber, coroideremia o enfermedad de Stargardt.

La presente invención también se refiere a un kit según la reivindicación 12; también se desvela un kit que comprende un polinucleótido según la presente invención y un compuesto que media la entrada celular.

El término "kit", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una colección de los compuestos mencionados anteriormente, a los medios o reactivos de la presente invención que pueden o no estar empaquetados juntos. Los componentes del kit pueden estar compuestos por viales separados (es decir, como un kit de partes separadas) o suministrados en un solo vial. Además, debe entenderse que el kit de la presente invención, preferentemente, se utilizará para poner en práctica los procedimientos mencionados anteriormente en el presente documento. Preferentemente, se prevé que todos los componentes se proporcionen de una manera lista para usar para poner en práctica los procedimientos mencionados anteriormente. Además, el kit, preferentemente, contiene instrucciones para llevar a cabo dichos procedimientos. Las instrucciones pueden ser proporcionadas por un manual del usuario en papel o en formato electrónico. Además, el manual puede comprender instrucciones para interpretar los resultados obtenidos al llevar a cabo los procedimientos mencionados anteriormente utilizando el kit de la presente invención. Tal como se entenderá por lo anterior, la descripción del kit que comprende polinucleótidos, preferentemente, se refiere a un kit que comprende los correspondientes vectores mutatis mutandis.

Preferentemente, el kit comprende además al menos un compuesto que media la entrada celular para el polinucleótido que comprende, el término "compuesto que media la entrada celular" se refiere a cualquier medio adecuado para hacer que un polinucleótido del kit entre en el interior de una célula hospedadora, preferentemente una célula hospedadora. Los compuestos adecuados que median la entrada de células (medios de administración) son conocidos en la técnica e incluyen en particular medios de transfección, composiciones de empaquetamiento y similares. Preferentemente, el polinucleótido de la presente invención está preempaquetado en un medio de administración, por ejemplo, en partículas víricas, más preferentemente en partículas víricas de replicación defectuosa, más preferentemente en partículas similares a virus (VLP). La persona experta conoce los medios de administración que proporcionan diferentes especificidades para los receptores celulares, de manera que se puedan seleccionar los medios de administración apropiados para una célula hospedadora diana dada.

La presente invención se refiere además a un dispositivo según la reivindicación 13; también se desvela un dispositivo que comprende un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, una composición según la presente invención y/o una célula hospedadora según la presente invención.

El término "dispositivo", tal como se usa en el presente documento se refiere a un sistema de medios que comprende al menos los medios unidos operativamente entre sí para permitir la administración del compuesto o de la composición de la presente invención. Los medios preferidos para administrar polinucleótidos, composiciones, células hospedadoras son bien conocidos en la técnica. La forma de vincular los medios de forma operativa dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo y del tipo de administración prevista. Preferentemente, los medios están compuestos por un único dispositivo en tal caso. Por consiguiente, dicho dispositivo puede incluir una unidad de suministro para la administración del compuesto o composición y una unidad de almacenamiento para almacenar dicho compuesto o composición hasta la administración. Sin embargo, también se contempla que los medios de la presente invención pueden aparecer como dispositivos separados en tal realización y son, preferentemente, empaquetados juntos como un kit. El experto en la técnica se dará cuenta de cómo unir los medios sin más preámbulos. Los dispositivos preferidos son aquellos que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un técnico especializado. En una realización preferida, el dispositivo es una jeringa, más preferentemente con una aguja, que comprende el compuesto o composición de la invención. En otra realización preferida, el dispositivo es un equipo de infusión intravenosa (IV) que comprende el compuesto o composición. En otra realización preferida, el dispositivo es un dispositivo endoscópico que comprende el compuesto o medicamento para lavar un sitio de administración, o que comprende además una aguja para la aplicación tópica del compuesto o composición, por ejemplo, a un tumor. En otra realización preferida más, el dispositivo es un inhalador que comprende el compuesto de la presente invención, en los que, más preferentemente, dicho compuesto está formulado para su administración en forma de aerosol.

La presente solicitud también se refiere a un procedimiento para transfectar de manera estable una célula hospedadora según la reivindicación 14; también se desvela un procedimiento para transfectar de manera estable una célula hospedadora, que comprende

- a) poner en contacto dicha célula hospedadora con un polinucleótido según la presente invención, una composición según la presente invención, y/o una célula hospedadora según la presente invención, y,
- b) por lo tanto, transfectar de forma estable una célula hospedadora.

El procedimiento para transfectar de forma estable una célula hospedadora de la presente invención, preferentemente, es un procedimiento *in vitro*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas explícitamente anteriormente. Por ejemplo, otras etapas pueden referirse, por ejemplo, a proporcionar una célula hospedadora o una muestra que comprenda la misma para la etapa a) y/o aplicar presión selectiva a las células hospedadoras en contacto. Además, una o más de dichas etapas se pueden realizar mediante equipo automatizado.

El experto entiende que la expresión transfección estable de una célula hospedadora se refiere a la introducción de un polinucleótido, preferentemente un polinucleótido heterólogo en una célula de manera que el polinucleótido sea replicado de forma estable por la célula hospedadora tal como se especifica anteriormente en el presente documento. Preferentemente, la transfección estable comprende la replicación episomal estable del polinucleótido. Preferentemente, la transfección estable comprende, después del contacto, aplicar presión selectiva a la célula hospedadora para seleccionar la presencia de un marcador seleccionable. La presión selectiva se aplica después del contacto, excluyendo opcionalmente un primer marco de tiempo que permite que el polinucleótido se establezca dentro de la célula hospedadora; la duración de dicho primer marco de tiempo que permite que el polinucleótido se establezca dentro de la célula hospedadora dependerá principalmente del tipo de célula hospedadora con la que se ponga en contacto y del tipo de marcador seleccionable usado; preferentemente, la duración de dicho primer marco de tiempo que permite que el polinucleótido se establezca dentro de la célula hospedadora es de 1 h a 48 h, más preferentemente de 2 h a 24, lo más preferentemente de 3 h a 16 h. Sin embargo, la duración de dicho primer marco de tiempo que permite que el polinucleótido se establezca dentro de la célula hospedadora también puede ser cero, es decir, se puede aplicar presión selectiva inmediatamente después de poner en contacto o incluso durante el contacto. Se puede aplicar presión selectiva de forma continua, es decir, esencialmente en todos los puntos de tiempo después del primer marco de tiempo, lo que permite que el polinucleótido se establezca dentro de la célula hospedadora, más preferentemente para evitar que proliferen las células hospedadoras que no comprenden el polinucleótido; o puede aplicarse de forma transitoria, más preferentemente para eliminar las células que no han recibido el polinucleótido. Preferentemente, la aplicación transitoria de presión selectiva se utiliza en los casos en que las células se transfieren

de nuevo a un organismo después de dicho contacto. Sin embargo, también se prevé que no se aplique presión selectiva, en particular en los casos en los que se sabe que la eficacia de transferencia del polinucleótido a las células hospedadoras diana es suficientemente alta y/o cuando una población pura de células hospedadoras transgénicas no es de gran importancia.

- 5 El término "contacto", tal como se usa en el contexto de los procedimientos de la presente invención, es entendido por el experto en la materia. Preferentemente, el término se refiere a poner al menos un polinucleótido, vector y/o célula hospedadora de la presente invención en contacto físico con una célula hospedadora, por ejemplo, permitir que la célula hospedadora y los compuestos interactúen. Preferentemente, el contacto incluye la administración de al menos un polinucleótido de la presente invención en el interior de una célula hospedadora, preferentemente a través de un medio de administración tal como se especifica anteriormente.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para tratar una enfermedad genética en un sujeto, que comprende

- 15 a) poner en contacto a dicho sujeto con un polinucleótido según la presente invención, una composición según la presente invención, y/o una célula hospedadora según la presente invención, y,
b) por lo tanto, tratar la enfermedad genética en dicho sujeto.

El procedimiento para tratar la enfermedad genética de la presente invención, preferentemente, es un procedimiento *in vivo*. Además, puede comprender etapas además de las mencionadas explícitamente anteriormente. Por ejemplo, otras etapas pueden referirse, por ejemplo, a proporcionar una célula hospedadora o una muestra que comprenda la misma para la etapa a), y/o volver a administrar dicha muestra o célula hospedadora al sujeto. Por lo tanto, el procedimiento para tratar la enfermedad genética, comprende las etapas del procedimiento para transfectar de manera estable una célula hospedadora tal como se especifica anteriormente. Además, una o más de dichas etapas se pueden realizar mediante equipo automatizado.

Además, la presente invención se refiere a un uso según la reivindicación 15; también se desvela un uso de un polinucleótido de la presente invención para modificar genéticamente de manera estable una célula hospedadora.

25 También, la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la fabricación de un medicamento. Y al uso de un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades genéticas, preferentemente enfermedad monogénica, más preferentemente enfermedad monogénica recesiva, lo más preferentemente fenilcetonuria, alcaptonuria, amaurosis congénita de Leber, coroideremia o enfermedad de Stargardt.

También, la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la modificación genética de una célula primaria, preferentemente un fibroblasto dérmico primario, para la generación de células madre pluripotentes inducidas (IPSC). Preferentemente, dicha célula primaria es una célula primaria de ratón o humana.

El experto entiende el término "célula primaria" como opuesto a una célula de una línea celular cultivada; por lo tanto, preferentemente, una célula primaria es una célula obtenida de un organismo vivo y que se ha cultivado durante un máximo de 20 pasajes, más preferentemente como máximo 15 pasajes, incluso más preferentemente como máximo 10 pasajes, aún más preferentemente como máximo 5 pasajes. Lo más preferentemente, las células primarias son células obtenidas directamente del tejido de un ser vivo, preferentemente un ratón o un ser humano.

El experto también entiende que la expresión "célula madre" se refiere a una célula no diferenciada o poco diferenciada con el potencial de diferenciarse en al menos dos tipos de células, preferentemente al menos cinco tipos de células, más preferentemente al menos un linaje celular completo. Preferentemente, la célula madre es una célula madre totipotente, más preferentemente una célula madre pluripotente. La expresión "Célula Madre Pluripotente Inducida" o "IPSC" se refiere a una célula madre pluripotente obtenida de una célula diferenciada, preferentemente una célula primaria diferenciada. Los procedimientos para generar IPSC son conocidos en la técnica e incluyen, preferentemente, la expresión de cuatro factores de transcripción en la célula (por ejemplo, de Takahashi y col. (2006), Cell. 126 (4):663).

La presente divulgación también se refiere al uso de un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la modificación genética de células madre embrionarias. La presente divulgación también se refiere al uso de un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades genéticas, preferentemente enfermedad monogénica, más preferentemente enfermedad monogénica recesiva, lo más preferentemente fenilcetonuria, alcaptonuria, amaurosis congénita de Leber, coroideremia o enfermedad de Stargardt, en el que dicho medicamento comprende células hospedadoras que comprenden un polinucleótido de la presente invención.

La presente divulgación también se refiere al uso de un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la modificación genética

de células madre para generar un animal transgénico no humano. La presente divulgación se refiere además al uso de un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la producción de un animal transgénico no humano.

5 La expresión "animal transgénico" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal no humano que comprende al menos un polinucleótido heterólogo, preferentemente introducido en dicho animal por procedimientos de ingeniería genética. Preferentemente, el animal transgénico comprende al menos uno, más preferentemente al menos 10, aún más preferentemente al menos 1000, incluso más preferentemente al menos 10000 células que comprenden al menos un polinucleótido según la presente invención.

10 También, la presente divulgación se refiere al uso de un polinucleótido según la presente invención, a una composición según la presente invención, y/o a una célula hospedadora según la presente invención, para la modificación genética de embriones unicelulares no humanos mediante inyección pronuclear.

Como entenderá el experto en la materia, la expresión "inyección pronuclear" se refiere a la inyección de material genético, preferentemente un polinucleótido de la presente invención, en el núcleo de un ovocito fertilizado, preferentemente para crear un animal transgénico no humano.

15 Leyendas de las figuras

20 Figura 1: Eficiencia de establecimiento y análisis de la población de células modificadas genéticamente: A) Una placa de cultivo celular con colonias teñidas con cristal violeta que se han formado después de 4 semanas de selección con puromicina; la eficacia del establecimiento del vector fue aproximadamente del 40 %; b) detección por FACS de fluorescencia de GFP en células seleccionadas con puromicina; la fluorescencia es muy homogénea y el número de células no fluorescentes es extremadamente bajo.

Figura 2: Resultado del rescate de plásmidos de vectores pS/MARt de poblaciones celulares establecidas: el ADN de las colonias bacterianas (números 1 a 12) obtenido en un experimento de rescate de plásmido se digirió con BamHI y se redisolvió mediante electroforesis en gel de agarosa; los carriles marcados con "p/SMART" contienen ADN de una colonia de bacterias que llevan el plásmido original tratado de la misma forma que antes.

25 Figura 3: Análisis por transferencia de Southern de vectores pSMART mantenidos en células seleccionadas: los oligonucleótidos que hibridaban con el gen GFP de pS/MARt se usaron como sondas para detectar el ADN del vector restringido por BamHI en extractos de células hospedadoras (pS/MARt1 a 3); el vector no transfectado se utilizó como control ("pS/MARt (+)").

30 Figura 4: Mapa vectorial de pS/MARt; ori: origen de replicación bacteriano, P2A: secuencia que codifica el péptido 2A autoescindible del teschovirus porcino 1, apolipoB MAR: secuencia S/MAR del gen de la apolipoproteína B.

Los siguientes ejemplos simplemente ilustrarán la invención. No se interpretarán, en ningún caso, como una limitación del ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Eficacia de establecimiento y análisis de la población de células modificadas genéticamente (Fig. 1)

35 La eficacia en la generación de células que expresan de manera estable se evaluó en un ensayo de formación de colonias usando pS/MARt (Fig. 4, SEQ ID NO:14). Tras la administración del ADN, las células positivas para la expresión del transgén de GFP se aislaron mediante clasificación FACS (FACS Aria II) y se sembraron 100 células en una placa de cultivo celular de 6 cm. Luego se cultivaron durante 4 semanas en presencia de 0,5 µg/ml de puromicina. Después de 4 semanas, las células se fijaron con PFA y las colonias se tiñeron con cristal violeta. El número de colonias se considera la eficacia de establecimiento del vector, es decir, el número de colonias que se forman por número de células clasificadas por FACS en placa. La generación de líneas de células estables es muy eficaz con más del 40 % de células transfectadas que se establecen (Fig. 1A)). El número de células que expresan transgén (GFP) se estimó mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la Fig. 1 b), pS/MARt genera poblaciones modificadas en las que la expresión del transgén es homogénea sin un número significativo de células negativas.

Ejemplo 2: Rescate de plásmidos de vectores pS/MARt de poblaciones celulares establecidas (Fig. 2)

45 Un procedimiento eficaz para determinar si los vectores de ADN se mantienen episomalmente con integridad dentro de las células modificadas es verificar que se pueden rescatar intactos en bacterias sin exposición previa. Para hacerlo, se cultivaron líneas celulares persistentemente establecidas modificadas con el plásmido pS/MARt en presencia del antibiótico Puromicina (0,5 µg/ml) durante 1 semana y se expandieron durante al menos 30 días sin antibiótico para evaluar la integridad del vector. El ADN total se preparó a partir de las células utilizando el kit Blood & Tissue DNAeasy (Qiagen) y se transformó en células *E. coli* DH10B. Las bacterias se cultivaron en placas de agar LB con kanamicina (50 µg/ml). Se cultivaron 12 colonias en medio LB líquido con kanamicina (50 µg/ml) durante la noche y se extrajo el ADN plasmídico con MiniprepKit (Qiagen). Para el análisis, las minipreparaciones de ADN se digirieron con la enzima de restricción BamHI (Thermo Fisher) durante 10 min a 37 °C y el patrón de restricción se abordó en un gel de agarosa al 1 %. Como control, el ADN utilizado para transfectar las células al comienzo del procedimiento de establecimiento se digirió con la misma enzima y se analizó como referencia. Estos geles ilustran que el ADN pS/MARt intacto podría

aislarse de líneas celulares modificadas estables y que en todos los casos el ADN era idéntico a los vectores transfectados originalmente.

Ejemplo 3: Los vectores pS/MARt se mantienen episomalmente en células modificadas (Fig. 3)

5 Para demostrar aún más que los vectores pS/MARt modificaban las células de mamífero como un episoma, la estructura se determinó físicamente mediante análisis por transferencia de Southern. Se analizaron las poblaciones de células Hek293T cultivadas durante al menos 30 días después de la transfección de ADN. El ADN genómico se extrajo con el kit Blood & Tissue DNAeasy (Qiagen) y se digirió durante la noche a 37 °C con la enzima de restricción BamHI (NEB). A continuación, el ADN celular total se separó en un gel de agarosa al 1 % y se transfirió a una membrana de nailon. Se utilizaron oligonucleótidos correspondientes al gen GFP del vector para generar la sonda radiactiva utilizada para detectar el ADN pS/MARt dentro del ADN celular. La presencia en las muestras de una única banda que tiene el mismo tamaño del vector de control demuestra el estado episomal de pS/MARt en las poblaciones de células de mamíferos establecidas. La ausencia de frotis y/o bandas alternativas demuestra que los vectores no se reorganizaron ni se integraron en el genoma celular.

LISTADO DE SECUENCIAS

15	<110> Deutsches Krebsforschungszentrum	
	<120> Vectores de ADN no integrantes para la modificación genética de células	
	<130> DK14791EP	
	<160> 14	
	<170> PatentIn versión 3.3	
20	<210> 1	
	<211> 4	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 1	
	atta	4
	<210> 2	
	<211> 5	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 2	
	attta	5
	<210> 3	
	<211> 11	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
	taaataattt a	11
	<210> 4	
	<211> 19	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
	attataaata ttttaatta	19
	<210> 5	
45	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
	atttaattat aaataattta atta	24
50	<210> 6	

ES 2 821 655 T5

<211> 525
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

atttataaaa tattgaatta taaaatatgt aattataaat actttaatta taaaatatgt 60
 aattataaat actttaatta taaaatatgt aattataaat actttataaaa atatgtaatt 120
 ataaaatatg taattataaaa cattttaatt ataaaatatg taattataaaa cattttaatt 180
 ataaaatatg taattataaaa cattttaatt ataaaatatg taattataaaa cattttaatt 240
 ataaaatatg taattataaaa cattttaatt ataaaatatg taattataaaa cattttaatt 300
 ataaaatatg taattataaaa cattttaatt ataaaatatg taattataaaa cattttaatt 360
 ataaaatatg taattataaaa cattttaatt ataaaatatg taattataaaa tactttaatt 420
 ataaaatatg taattataaaa cattttaatt ataaaatatg taattataaaa tattttaatt 480
 ataaaatatg taattataaaa cattttaatt ataaaatatg taattataaaa tattttaatt 525

5

<210> 7
 <211> 825
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

gcaggctgag tgaataaag gacttggtat ttcattctcga ggcctaccgg agagccttgc 60
 cttgcaaagg cagacagtca gtgaggaaga ctatgtggca catgaagaca ccagaggtgt 120
 tcctcaggat caaagtatgt acaagccttt gtgaatattt tttccttctc acttggtgcaa 180
 tacaattcct gagatcaata acctcgtctt ttttaattttt tcctcgtctt ttaactatt 240
 tataaaatat tgaattataa aatatgtaat tataaatact ttaattataa aatatgtaat 300
 tataaatact ttaattataa aatatgtaat tataaatact ttataaaata tgtaattata 360
 aatatgtaa ttataaacat ttttaattata aatatgtaa ttataaacat ttttaattata 420
 aatatgtaa ttataaacat ttttaattata aatatgtaa ttataaacat ttttaattata 480
 aatatgtaa ttataaacat ttttaattata aatatgtaa ttataaacat ttttaattata 540
 aatatgtaa ttataaacat ttttaattata aatatgtaa ttataaacat ttttaattata 600
 aatatgtaa ttataaacat ttttaattata aatatgtaa ttataaacat ttttaattata 660
 aatatgtaa ttataaacat ttttaattata aatatgtaa ttataaacat ttttaattata 720
 aatatgtaa ttataaacat ttttaattata aatatgtaa ttataaacat ttttaattata 780
 ttttgcaaaa tatttcctc cataatttct cggtttccat tttta 825

10

<210> 8
 <211> 854
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

15

ES 2 821 655 T5

cttctccact cctggcaggc tgagtgaaat aaaggacttg ttatttcac ctcgaggccta 60
 ccggagagcc ttgccttgca aaggcagaca gtcagtgagg aagactatgt ggcacatgaa 120
 gacaccagag gtgttcctca ggatcaaagt atgtacaagc ctttgtgaat attttttcct 180
 tctcacttgg caaatacaat tcctgagatc aataacctcg tctttttaat tttttcctcg 240
 tctttttaac tatttataaa atattgaatt ataaaatag taattataaa tactttaatt 300
 ataaaatag taattataaa tactttaatt ataaaatag taattataaa tactttataa 360
 aatagtaat tataaaatat gtaattataa acattttaat tataaaatat gtaattataa 420
 acattttaat tataaaatat gtaattataa acattttaat tataaaatat gtaattataa 480
 acattttaat tataaaatat gtaattataa acattttaat tataaaatat ttaattataa 540
 acattttaat tataaaatat ttaattataa atattttaat tataaaatat ttaattataa 600
 atattttaat tataaaatat ttaattataa atattttaat tataaaatat ttaattataa 660
 atactttaat tataaaatat ttaattataa atattttaat tataaaatat ttaattataa 720
 atattttaat tataaatatt ttaattataa aatatttaat tataaaaaca caattacctc 780
 atctttttaa atatttttgc aaaatatttc cctccataat ttctccgttt ccatttttat 840
 tctgttactt aaat 854

<210> 9
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> puromicina acetiltransferasa, construcción sintética
 <400> 9

ES 2 821 655 T5

Met Thr Glu Tyr Lys Pro Thr Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val
 1 5 10 15

Pro Arg Ala Val Arg Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala
 20 25 30

Thr Arg His Thr Val Asp Pro Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu
 35 40 45

Leu Gln Glu Leu Phe Leu Thr Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val
 50 55 60

Trp Val Ala Asp Asp Gly Ala Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu
 65 70 75 80

Ser Val Glu Ala Gly Ala Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala
 85 90 95

Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu
 100 105 110

Leu Ala Pro His Arg Pro Lys Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val
 115 120 125

Gly Val Ser Pro Asp His Gln Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val
 130 135 140

Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu
 145 150 155 160

Glu Thr Ser Ala Pro Arg Asn Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe
 165 170 175

Thr Val Thr Ala Asp Val Glu Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys
 180 185 190

Met Thr Arg Lys Pro Gly Ala
 195

<210> 10
 <211> 600
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> secuencia que codifica la puromicina acetiltransferasa, construcción sintética

<400> 10

ES 2 821 655 T5

atgaccgagt acaagcccac ggtgcgctc gccacccgcg acgacgtccc ccgggcccgt 60
cgcaccctcg ccgccgcggt cgccgactac cccgccacgc gccacaccgt cgacccggac 120
cgccacatcg agcgggtcac cgagctgcaa gaactcttcc tcacgcgcgt cgggctcgac 180
atcggcaagg tgtgggtcgc ggacgacggc gccgcggtgg cggctctggac cacgccggag 240
agcgtcgaag cgggggcggt gttcgccgag atcggcccgc gcatggccga gttgagcggg 300
tcccggctgg ccgcgagca acagatggaa ggctcctgg cgccgcaccg gcccaaggag 360
cccgcgtggt tcctggccac cgtcggcgtc tcgcccgacc accagggcaa gggctctgggc 420
agcgcctcg tgctccccgg agtggaggcg gccgagcgcg ccgggggtgcc cgcttctctg 480
gagacctcg cgccccgcaa cctccccttc tacgagcggc tcgggttcac cgtcacccgc 540
gacgtcgagg tgcccgaagg accgcgcacc tgggtgatga cccgcaagcc cgggtgcctga 600

<210> 11
<211> 1031
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> elemento anti-represivo 40
<400> 11

ES 2 821 655 T5

gatcaagaaa gcactccggg ctccagaagg agccttccag gccagctttg agcataagct 60
gctgatgagc agtgagtgtc ttgagtagtg ttcagggcag catgttacca ttcattgcttg 120
acttctagcc agtgtgacga gaggctggag tcaggtctct agagagttga gcagctccag 180
ccttagatct cccagttctta tgcgggtgtc ccattcgctt tgtgtctgca gtcccctggc 240
cacaccagc aacagttctg ggatctatgg gagtagcttc cttagtgagc tttcccttca 300
aatactttgc aaccaggtag agaagtttgg agtgaagggt ttgttcttcg tttcttcaca 360
atatggatat gcatcttctt ttgaaaatgt taaagtaaat tacctctctt ttcagatact 420
gtcttcatgc gaacttggtg tctgttttcc atcccagcct tctataacc agtaacatct 480
tttttgaac cagtgggtga gaaagacacc tggtcaggaa cgcggaccac aggacaactc 540
aggctcacc acggcatcag actaaaggca aacaaggact ctgtataaag taccggtggc 600
atgtgtatta gtggagatgc agcctgtgct ctgcagacag ggagtcacac agacactttt 660
ctataatttc ttaagtgtt tgaatgttca agtagaaagt ctaacattaa atttgattga 720
acaattgtat attcatggaa tattttggaa cggaatacca aaaaatggca atagtggttc 780
tttctggatg gaagacaaac ttttcttctt taaaataaat tttattttat atatttgagg 840
ttgaccacat gaccttaagg atacatatag acagtaaact ggttactaca gtgaagcaaa 900
ttaacatata taccatogta catagttaca tttttttgtg tgacaggaac agctaaaatc 960
tacgtattta acaaaactcc taaagacaat acatttttat taactatagc cctcatgatg 1020
tacattagat c 1031

<210> 12
<211> 1438
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Promotor de CMV - Secuencia S/MAR

<400> 12
ggcattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca 120
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagggg 180
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240
aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300
ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360
tagtcatcgc tattaccatg gtgatgagggt tttggcagta caccaatggg cgtggatagc 420

ES 2 821 655 T5

ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480
 ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa 540
 tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag aggtcttctc cactcctggc 600
 aggctgagtg aaataaagga cttgttattt catctcgagg cctaccggag agccttgcc 660
 tgcaaaggca gacagtcagt gaggaagact atgtggcaca tgaagacacc agaggtgttc 720
 ctcaggatca aagtatgtac aagcctttgt gaatattttt tccttctcac ttggcaaata 780
 caattcctga gatcaataac ctcgtctttt taattttttc ctcgtctttt taactattta 840
 taaaatattg aattataaaa tatgtaatta taaatacttt aattataaaa tatgtaatta 900
 taaatacttt aattataaaa tatgtaatta taaatacttt ataaaatag taattataaa 960
 atatgtaatt ataaacattt taattataaa atatgtaatt ataaacattt taattataaa 1020
 atatgtaatt ataaacattt taattataaa atatgtaatt ataaacattt taattataaa 1080
 atatgtaatt ataaacattt taattataaa atatttaatt ataaacattt taattataaa 1140
 atatttaatt ataaatattt taattataaa atatttaatt ataaatattt taattataaa 1200
 atatttaatt ataaatattt taattataaa atatttaatt ataaatattt taattataaa 1260
 atatttaatt ataaatattt taattataaa atatttaatt ataaatattt taattataaa 1320
 tattttaatt ataaaatatt taattataaa aacacaatta cctcatcttt ttaaattttt 1380
 ttgcaaaaata tttccctcca taatttctcc gtttccattt ttattctggt acttaaat 1438

<210> 13
 <211> 2038
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Promotor de CMV - Puromicina - Secuencia S/MAR

<400> 13

ggcattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
 catatatgga gttccgcggt acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca 120
 acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagga 180
 ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240
 aagtgtatca tatgccaagt ccgccccta ttgacgtcaa tgacggtaa tggcccgcct 300
 ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360
 tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta caccaatggg cgtggatagc 420
 ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480
 ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa 540

ES 2 821 655 T5

tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag aggtatgacc gagtacaagc 600
ccacggtgcg cctcggccacc cgcgacgacg tccccggggc cgtacgcacc ctgcgcgccc 660
cgttcgccga ctaccccgcc acgcgccaca ccgtcgaccc ggaccgccac atcgagcggg 720
tcaccgagct gcaagaactc ttcctcacgc gcgtcgggct cgacatcggc aagggtgtggg 780
tcgcgggacga cggcgccgcg gtggcgggtct ggaccacgcc ggagagcgtc gaagcggggg 840
cgggtgttcgc cgagatcggc ccgcgcatgg ccgagttgag cggttcccgg ctggccgcgc 900
agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc accggcccaa ggagcccgcg tggttcctgg 960
ccaccgtcgg cgtctcggcc gaccaccagg gcaagggctc gggcagcgcc gtcgtgctcc 1020
ccggagtgga ggcggccgag cgcgcccggg tgcccgcctt cctggagacc tccgcgcccc 1080
gcaacctccc cttctacgag cggctcggct tcaccgtcac cgccgacgtc gaggtgcccg 1140
aaggaccgcg cacctggtgc atgaccgcga agcccgggtc ctgacttctc cactcctggc 1200
aggctgagtg aaataaagga cttgttattt catctcgagg cctaccggag agccttgctt 1260
tgcaaaggca gacagtcagt gaggaagact atgtggcaca tgaagacacc agaggtgttc 1320
ctcaggatca aagtatgtac aagcctttgt gaatattttt tccttctcac ttggcaaata 1380
caattcctga gatcaataac ctcgtctttt taattttttc ctcgtctttt taactattta 1440
taaaatattg aattataaaa tatgtaatta taaatacttt aattataaaa tatgtaatta 1500
taaatacttt aattataaaa tatgtaatta taaatacttt ataaaatag taattataaa 1560
atatgtaatt ataaacattt taattataaa atatgtaatt ataaacattt taattataaa 1620
atatgtaatt ataaacattt taattataaa atatgtaatt ataaacattt taattataaa 1680
atatgtaatt ataaacattt taattataaa atatttaatt ataaacattt taattataaa 1740
atatttaatt ataaatattt taattataaa atatttaatt ataaatattt taattataaa 1800
atatttaatt ataaatattt taattataaa atatttaatt ataaatactt taattataaa 1860
atatttaatt ataaatattt taattataaa atatttaatt ataaatattt taattataaa 1920
tattttaatt ataaaatatt taattataaa aacacaatta cctcatcttt ttaaattttt 1980
ttgcaaaata tttccctcca taatttctcc gtttccattt ttattctggt acttaaat 2038

<210> 14
<211> 6189
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Elemento 40-GPF-P2A-Puromicina-S/MAR
<400> 14

ES 2 821 655 T5

ggcattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcggt acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgccca 120

ES 2 821 655 T5

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagggga 180
 ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240
 aagtgtatca tatgccaaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccccgct 300
 ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360
 tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta caccaatggg cgtggatagc 420
 ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480
 ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa 540
 tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag aggtcgttta gtgaaccgtc 600
 agatcactag tagctttatt gcggtagttt atcacagtta aattgctaac gcagtcagtg 660
 ctcgactgat cacaggtaag tatcaaggtt acaagacagg ttttaaggagg ccaatagaaa 720
 ctgggcttgt cgagacagag aagattcttg cgtttctgat aggcacctat tggcttact 780
 gacatccact ttgcctttct ctccacaggg gtaccgaagc cgctagcgct accggctgcc 840
 accatgcccc ccatgaagat cgagtgccgc atcacccggca ccctgaacgg cgtggagttc 900
 gagctggtgg gcggcggaga gggcaccccc gagcagggcc gcattgaccaa caagatgaag 960
 agcaccaaaag gcgccctgac cttcagcccc tacctgctga gccacgtgat gggctacggc 1020
 ttctaccact tcggcaccta ccccagcggc tacgagaacc ccttcctgca cgccatcaac 1080
 aacggcggct acaccaacac ccgcatcgag aagtacgagg acggcggcgt gctgcacgtg 1140
 agcttcagct accgctacga ggccggccgc gtgatcggcg acttcaaggt ggtgggcacc 1200
 ggcttccccg aggacagcgt gatcttcacc gacaagatca tccgcagcaa cgccaccgtg 1260
 gagcacctgc accccatggg cgataacgtg ctggtgggca gcttcgcccg caccttcagc 1320
 ctgcgcgacg gcggctacta cagcttcgtg gtggacagcc acatgcactt caagagcgcc 1380
 atccacccca gcatcctgca gaacgggggc cccatgttcg ccttcgcccg cgtggaggag 1440
 ctgcacagca acaccgagct gggcatcgtg gagtaccagc acgccttcaa gacccccatc 1500
 gccttcgcca gatctggcag cggcgccacc aacttcagcc tgctgaagca ggccggcgac 1560
 gtggaggaaa accctgggcc catgaccgag tacaagccca cggtgccctt cgccaccgcg 1620
 gacgacgtcc cccgggcccgt acgcaccctc gccgcgcgct tcgcccacta ccccgccacg 1680
 cgccacaccg tcgaccggga ccgccacatc gagcgggtca ccgagctgca agaactcttc 1740
 ctcacgcgcg tcgggctcga catcggcaag gtgtgggtcg cggacgacgg cgcccggtg 1800
 gcggtctgga ccacgccgga gagcgtcgaa gcggggggcg tgcttcgcca gatcggcccc 1860
 cgcatggccg agttgagcgg tccccgctg gccgcgcagc aacagatgga aggcctcctg 1920
 gcgcccacc ggcccaagga gcccgctgg ttctcggcca ccgtcggcgt ctgcgccgac 1980

ES 2 821 655 T5

caccagggca agggctctggg cagcgccgctc gtgctccccg gagtggaggc ggccgagcgc 2040
 gccggggtgc ccgccttcct ggagacctcc gcgccccgca acctccccct ctacgagcgg 2100
 ctcggttca ccgtcaccgc cgacgtcgag gtgcccgaag gaccgcgcac ctggtgcatg 2160
 acccgcaagc ccggtgcctg aagatctatg catgcagaag ttggtcgtga ggcactgggc 2220
 aggtaagtat caaggttaca agacaggtcg acttctccac tcctggcagg ctgagtgaaa 2280
 taaaggactt gttatttcat ctcgaggcct accggagagc cttgccttgc aaaggcagac 2340
 agtcagtgag gaagactatg tggcacatga agacaccaga ggtgttcctc aggatcaaag 2400
 tatgtacaag cctttgtgaa tttttttcc ttctcacttg gcaatacaa ttctgagat 2460
 caataacctc gtctttttaa ttttttcctc gtctttttaa ctatttataa aatattgaat 2520
 tataaaatat gtaattataa atactttaat tataaaatat gtaattataa atactttaat 2580
 tataaaatat gtaattataa atactttata aaatatgtaa ttataaaata tgtaattata 2640
 aacattttaa ttataaaata tgtaattata aacattttaa ttataaaata tgtaattata 2700
 aacattttaa ttataaaata tgtaattata aacattttaa ttataaaata tgtaattata 2760
 aacattttaa ttataaaata ttttaattata aacattttaa ttataaaata ttttaattata 2820
 aatattttaa ttataaaata ttttaattata aatattttaa ttataaaata ttttaattata 2880
 aatattttaa ttataaaata ttttaattata aatattttaa ttataaaata ttttaattata 2940
 aatattttaa ttataaaata ttttaattata aatattttaa ttataaaata ttttaattata 3000
 aaatatttaa ttataaaaac acaattacct catcttttta aatatttttg caaaaatatt 3060
 ccctccataa tttctccggt tccattttta ttctgttact taaataattc tgcagtcgac 3120
 ggttactgac atccactttg cttttctctc cacaggtgtc cactctaccg cgggcccggg 3180
 atccaccgga tctagataac tgatcataat cagccatacc acattttag aggttttact 3240
 tgctttaaaa aaacctccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt 3300
 tgttgtaaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 3360
 tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 3420
 tgtatcttac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt 3480
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 3540
 tcagaggtgg cgaaaccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 3600
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacggga tacctgtccg cctttctccc 3660
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt 3720
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 3780
 atccgtaaac tatcgtcttg agtccaacct ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 3840
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 3900

ES 2 821 655 T5

gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtatth ggtatctgcg ctctgctgaa 3960
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg 4020
 tagcgggtgg ttttttgtht gcaagcagca gattacgchg agaaaaaaag gatctcaaga 4080
 agatcctthg atctthtcta cgggggtctga cgctcagthg aacgaaaact cacgthtaagg 4140
 gattthggth atgccgthctc agaagaactc gthcaagaagg cgatagaagg cgatgchgctg 4200
 cgaatcggga gcggcgatac cgtaaagcac gaggaagchg tcagcccatt cgccgccaag 4260
 ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc tatgthctga tagcggthccg ccacaccag 4320
 ccggccacag thgatgaatc cagaaaagcg gccatthtcc accatgatat tcggcaagca 4380
 ggcathgcca tgggtcacga cgagathctc gccgthcggc atgthcgcct thagcctggc 4440
 gaacagthtg gthggcgcgga gccctgath ctctthcgtcc agathathctc gathgacaag 4500
 accggtthcc atccgathac gthgthctctc gathgchgath thcgtthggg gthcgaathg 4560
 gcagthtagc ggathcaagcg ththgchccg ccgaththca thcagccath thgathactth 4620
 ctggcgagga gcaagthgag athgachggag athctgcccc ggcactthcg ccaathagcag 4680
 ccagthccctt cccgctthcag thgacaacgth gaththacgct gcgcaaggaa cgcccgthcgt 4740
 ggcchagccac gathagccgcg ctgctcgtc thgchagthca thcagggcac cggachaggtc 4800
 ggtctthgaca aaaagaaccg ggcgccccctg cgthgchagc cggaacacgg cggathcaga 4860
 gcagccgath gthctgthtg cccagthcata gccgaathagc ctctccacc aagcgthccg 4920
 agaacctgcg thgcaathcat ctthgthcaat cataathata thgathgath thathaggtth 4980
 cgtctcgtcc cggthctctc ccatgchath caathathggc cathagccath athathcath 5040
 ggtthathag cathaaathca thathggctath thggccathgc athagthgta thctathath 5100
 aathathgata aagctthgath aagaagcac thccgggctcc agathgagcc thccagthca 5160
 gctththgacha thagctgctg athgachagth agthgthctga gthagththca gggchagcath 5220
 thathcathca thgctthgact ctathccagth thgachgaggg ctggagthcag gthctathag 5280
 agththgach cthccagcct agathctcca gthctthathcg gthgthcccat thcgtththg 5340
 ththgchagth cctggccaca cccagthaca gthctthggath ctathgggath agctthcctth 5400
 gthgagctthc cctthcaatha cththgcaacc aggthagagaa gththggagth aaggtththg 5460
 thctthgththc thcacaath gathathgath ctthctththga aathgthaaa gthaaathacc 5520
 thctthththca gathactgthct thathgchaac thggthathct gththccathc chagctthcta 5580
 thaaaccagth acathctthth thgaaaccagth gggthgagaaa gachaccgth chaggaacgch 5640
 gaccachagga caathcagch thcaccchag chathchagctha aagthcaaca aggathctgth 5700
 athaaagthacc gthggchathg thathathgth agathgchagc thgthctctgc agachgggag 5760

ES 2 821 655 T5

tcacacagac	acttttctat	aatttcttaa	gtgctttgaa	tgttcaagta	gaaagtctaa	5820
cattaaattt	gattgaacaa	ttgtatattc	atggaatatt	ttggaacgga	ataccaaaaa	5880
atggcaatag	tggttctttc	tggatggaag	acaaactttt	cttctttaa	ataaatttta	5940
ttttatatat	ttgaggttga	ccacatgacc	ttaaggatac	atatagacag	taaactggtt	6000
actacagtga	agcaaattaa	catatctacc	atcgtacata	gttacatfff	tttgtgtgac	6060
aggaacagct	aaaatctacg	tatttaacaa	aactcctaaa	gacaatacat	ttttattaac	6120
tatagccctc	atgatgtaca	ttagatctgt	acatttatat	tggctcatgt	ccaatatgac	6180
cgccatggt						6189

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende al menos un promotor y un elemento S/MAR, en el que dicho elemento S/MAR está ubicado corriente abajo de dicho promotor y en el que la secuencia de ácido nucleico de dicho elemento S/MAR (secuencia S/MAR) comprende al menos 3 motivos de secuencia ATTA (SEQ ID NO:1) y al menos un motivo de secuencia TAAATATTTTA (SEQ ID NO:3) por 100 nucleótidos en un tramo de 200 nucleótidos como máximo; preferentemente comprende al menos 20 motivos de secuencia ATTA sobre una secuencia de 500 nucleótidos, en el que dicho polinucleótido comprende además una secuencia codificante que codifica un marcador seleccionable (secuencia del marcador seleccionable), estando dicha secuencia del marcador seleccionable entre dicho promotor y dicho elemento S/MAR, preferentemente en la que dicho promotor y dicha secuencia del marcador seleccionable juntos constituyen un gen marcador seleccionable.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que dicho marcador seleccionable es una secuencia de ácido nucleico que confiere, cuando se expresa en una célula hospedadora, resistencia a al menos una condición que media la presión selectiva sobre una célula hospedadora cuando se aplica a la misma.
3. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el marcador seleccionable es un marcador seleccionable de una célula eucariota.
4. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a puromicina, un gen de resistencia a blasticidina, un gen de resistencia a la neomicina o un gen de resistencia a la zeocina, preferentemente es un gen de resistencia a puromicina.
5. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el gen marcador seleccionable está desprovisto de una señal de poli-A y de una señal o señales de terminación de la transcripción.
6. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el gen marcador seleccionable comprende una secuencia de ácido nucleico que
- a) provoca la expresión de un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:9;
 - b) provoca la expresión de un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:9;
 - c) comprende la secuencia de la SEQ ID NO:10;
 - d) comprende una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:10,
 - e) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende, que consiste preferentemente en, la secuencia de la SEQ ID NO:9, y/o
 - f) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de resistencia a puromicina que comprende, que consiste preferentemente en, una secuencia al menos el 70 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:9.
7. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha secuencia S/MAR está ubicada inmediatamente corriente abajo de dicho promotor y de dicho gen marcador seleccionable, preferentemente en el que estar ubicado inmediatamente corriente abajo es que está ubicado en una proximidad tal que las transcripciones de la secuencia del marcador seleccionable comprenden una secuencia S/MAR transcrita.
8. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho polinucleótido se replica episomalmente en una célula hospedadora, preferentemente en el que la replicación episomal es una replicación episomal estable, preferentemente en una célula de mamífero.
9. Una composición que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, preferentemente en la que dicha composición es una composición farmacéutica.
10. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, preferentemente en la que dicha célula hospedadora es una célula progenitora CD34+; un trombocito CD61+; un linfocito B CD19+; un monocito CD14+; un granulocito CD15+; un linfocito T citotóxico CD3+, preferentemente también positivo para CD8 y CD45; un linfocito T CD3+ colaborador, preferentemente también positivo para CD4 y CD45; un linfocito T CD3+ activado, preferentemente también positivo para CD25 y CD45, un linfocito infiltrante de tumor o un linfocito citolítico natural (NK).
11. Un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, una composición según la reivindicación 9, y/o una célula hospedadora según la reivindicación 10, para su uso en medicina, preferentemente, para su uso en el tratamiento de enfermedades genéticas, preferentemente enfermedad monogénica, más preferentemente enfermedad monogénica recesiva, lo más preferentemente fenilcetonuria, alcaptonuria, amaurosis congénita de Leber, coroideremia o enfermedad de Stargardt.
12. Un kit que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un compuesto que media la entrada celular.

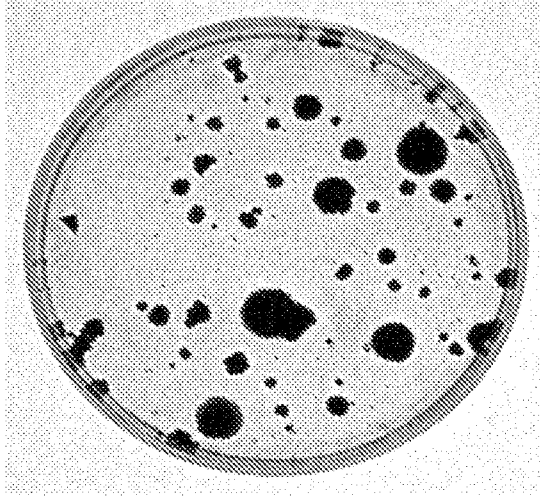
13. Un dispositivo que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, una composición según la reivindicación 9, y/o una célula hospedadora según la reivindicación 10.

14. Un procedimiento para transfectar de forma estable una célula hospedadora, que comprende

- 5 a) poner en contacto dicha célula hospedadora con un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, una composición según la reivindicación 9 y/o una célula hospedadora según la reivindicación 10, y,
 b) mediante ello, transfectar de forma estable una célula hospedadora.

15. Uso de un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para modificar genéticamente de manera estable una célula hospedadora.

A



B

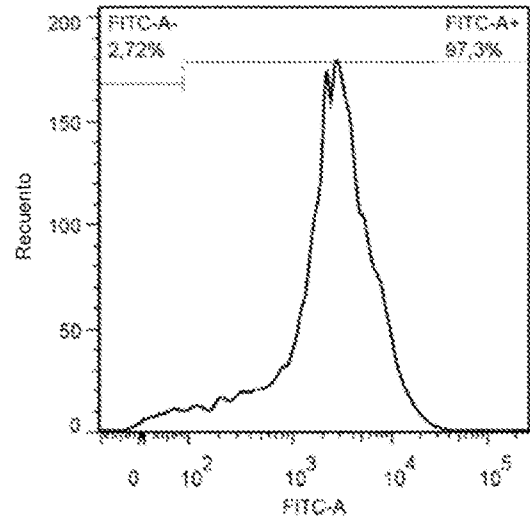


Fig. 1

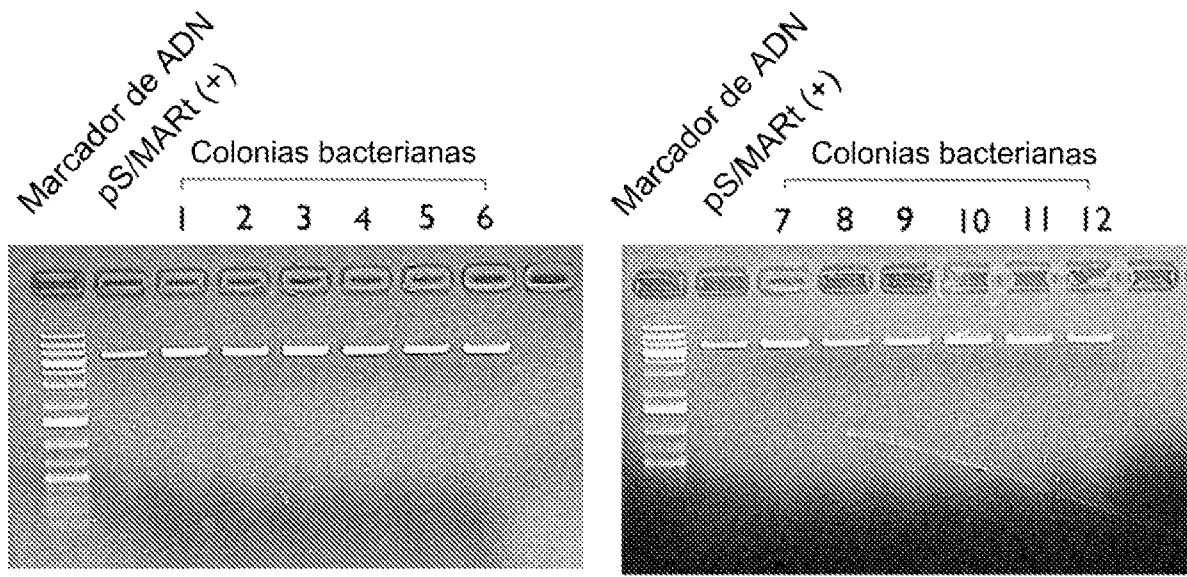


Fig. 2

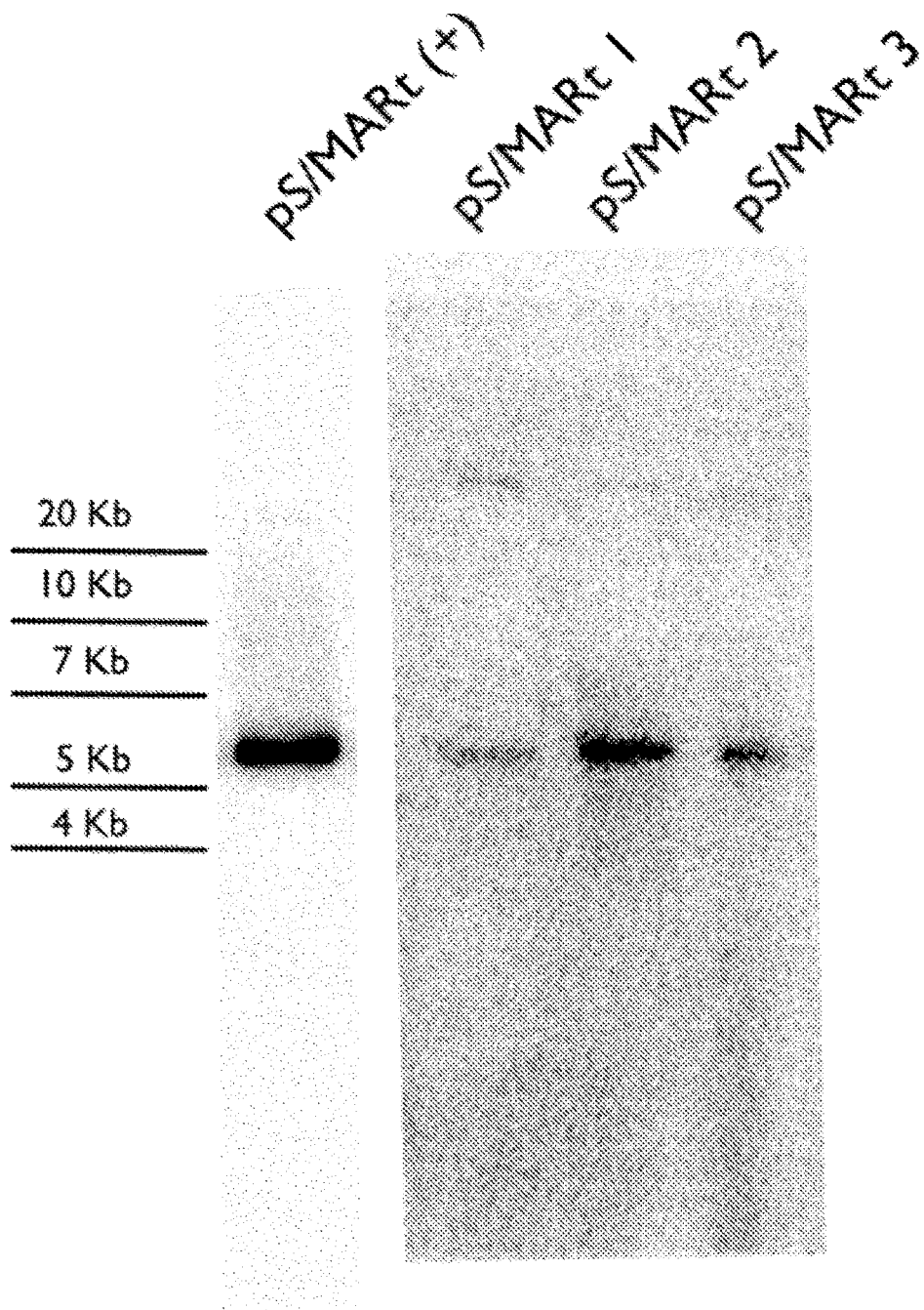


Fig. 3

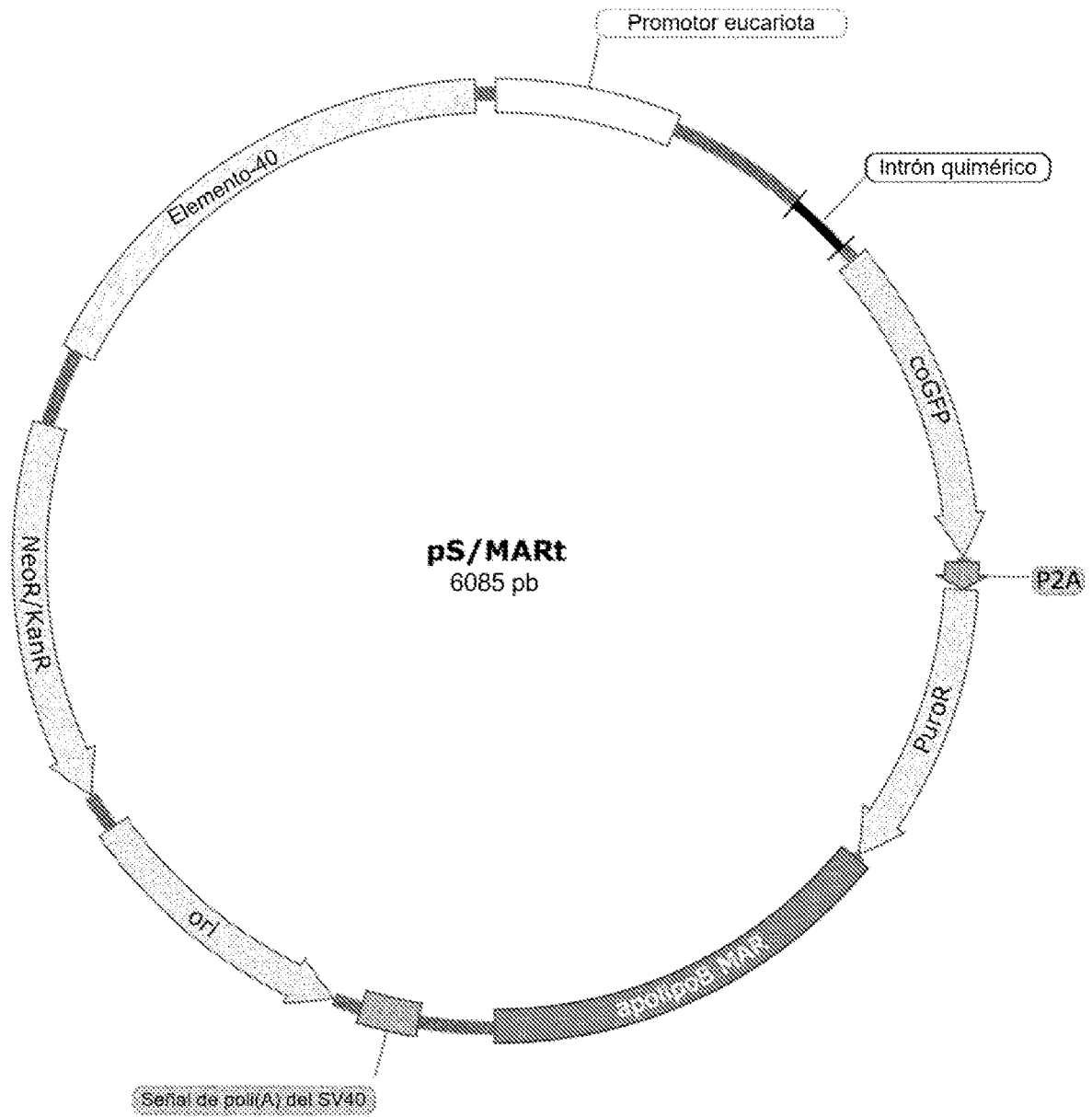


Fig. 4