

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 907**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/87** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2016 PCT/CN2016/109510**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17101749**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2016 E 16874806 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 3359676**

54 Título: **Sistema de transposón, kit que lo comprende y sus usos**

30 Prioridad:

**14.12.2015 US 201561267270 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.10.2021**

73 Titular/es:

**GENOMEFRONTIER THERAPEUTICS, INC.  
(100.0%)  
18F-1, No.3, Park St., Nangang Dist.  
Taipei City 115, Taiwan (R.O.C.), TW**

72 Inventor/es:

**WU, SAREINA CHIUNG-YUAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 870 907 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Sistema de transposón, kit que lo comprende y sus usos

### Antecedentes de la invención

#### 1. Campo de la invención

- 5 La presente descripción se refiere, en general, a sistemas, kits y métodos para modificar células para que porten genes de interés; y a los usos de las células modificadas como agentes terapéuticos para tratar sujetos que lo necesiten.

#### 2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 El transposón PiggyBac (PB) es un elemento genético móvil que se transpone con eficacia entre vectores y cromosomas a través de un mecanismo de "corte y pegado". Durante la transposición, la PB transposasa reconoce secuencias repetidas terminales invertidas ("inverted terminal repeat sequences", ITRs) específicas de transposón ubicada en ambos extremos del vector de transposón y mueve los contenidos desde los sitios originales y los integra de modo eficaz en sitios cromosómicos TTAA. La poderosa actividad del sistema de transposón PB permite mover con eficacia genes de interés entre las dos ITRs en el vector de PB hacia los genomas diana.

- 15 Las características exclusivas de los transposones PB incluyen: (1) no hay límite de carga; se ha indicado que el transposón PB puede movilizar fragmentos de ADN de hasta 100 kilobases hacia el interior de las células diana; (2) el proceso de transposición es reversible; los genomas que contienen un vector de PB insertado pueden ser transfectados de modo transitorio con un vector que solo exprese la PB transposasa, para eliminar los transposones del genoma; y (3) los usos del transposón PB no se limita a una especie específica; el transposón PG específico de  
20 TTAA es un transposón muy útil para la modificación genética de una amplia diversidad de especies, por ejemplo, células de insecto y células de mamífero. Además, en comparación con los vectores virales, el transposón PB tiene baja inmunogenicidad.

- 25 El sistema inmunitario desempeña un papel crucial en la salud humana. La deficiencia o disfunción del sistema inmunitario disminuye la capacidad del cuerpo para eliminar células corporales anómalas y patógenos invasores, provocando una vulnerabilidad frente a tumores e infecciones. Por otra parte, cuando el sistema inmunitario es demasiado activo, entonces el cuerpo ataca y daña a sus propios tejidos y, por consiguiente, esto conduce al desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria y a inflamación. Por tanto, la regulación de la expresión, la función o la interacción de las células inmunitarias, por ejemplo, introduciendo un gen exógeno (i) para sobrerregular o  
30 infrarregular la expresión génica de las células inmunitarias, o (ii) para potenciar o suprimir la función de las células inmunitarias, puede proporcionar un medio potencial para prevenir y/o tratar enfermedades relacionadas con la inmunidad. Sin embargo, es difícil que las células inmunitarias expresen constantemente un gen exógeno, lo cual limita su uso en la terapia celular.

- 35 Por consiguiente, en la técnica relacionada es necesario un sistema de expresión y métodos mejorados que permitan que una secuencia de ADN exógeno, por ejemplo, un gen, sea expresada de modo eficaz y constante en las células inmunitarias, las cuales puede emplearse posteriormente para una terapia celular para prevenir o tratar enfermedades y/o trastornos relacionados con la inmunidad.

### Resumen

- 40 Un objeto de la invención es un método *in vitro* para integrar una secuencia de ADN exógeno en el genoma de una célula. El método se realiza (i) obteniendo un sistema de transposón que incluye (a) un primer vector que contiene una primera repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:1, la secuencia de ADN exógeno cadena abajo de la primera repetición invertida, y una segunda repetición invertida cadena abajo de la secuencia de ADN exógeno, teniendo la segunda repetición invertida una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:2, y (b) un segundo vector que contiene un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una transposasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4; y (ii)  
45 introducir el primer vector y el segundo vector en la célula. Según la invención, el primer vector es un minicírculo de ADN que carece de las secuencias procariotas requeridas para la replicación bacteriana. La secuencia de ADN exógeno se integra en el genoma de la célula en virtud de la transposasa, que se expresa en la célula y cataliza la escisión de la secuencia de ADN exógeno del primer vector y la integración del ácido nucleico exógeno escindido en el genoma de la célula.

- 50 También se describe un kit para la integración de una secuencia de ADN exógeno en el genoma de una célula. El kit contiene (i) un recipiente; (ii) un sistema de transposón que incluye (a) un primer vector que contiene una primera repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:1, una segunda repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:2 cadena abajo de la primera repetición invertida, y un sitio de clonación entre la primera repetición invertida y la segunda repetición  
55 invertida para introducir la secuencia de ADN exógeno, y (b) un segundo vector que contiene un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una transposasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO:4; y (iii) unas instrucciones asociadas con el recipiente y que indican cómo se usa el sistema de transposón. Según la invención, el primer vector es un minicírculo de ADN que carece de las secuencias procariotas requeridas para la replicación bacteriana. La transposasa cataliza la escisión de la secuencia de ADN exógeno del primer vector y la integración de la secuencia de ADN exógeno escindida en el genoma de la célula.

5 Además, la presente descripción describe un método para tratar un sujeto que padece o que se sospecha que padece una enfermedad relacionada con la inmunidad. El método incluye integrar una secuencia de ADN exógeno en el genoma de una célula inmunitaria usando el método *in vitro* descrito anteriormente, preferiblemente con el kit también descrito anteriormente, para producir una célula inmunitaria modificada, y administrar una cantidad eficaz de la célula inmunitaria modificada al sujeto para mejorar o aliviar los síntomas de la enfermedad relacionada con la  
10 inmunidad.

Muchas de las consiguientes características y ventajas de la presente descripción se entenderán mejor remitiéndose a la siguiente descripción detallada, considerada en conexión con los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1A es un histograma que muestra el número de colonias resistentes a la higromicina de células HEK293 cotransfectadas con el plásmido auxiliar indicado y un donante de ADN (forma circular) producido mediante el método de digestión con enzimas/acoplamiento;

La figura 1B es un histograma que muestra el número de colonias resistentes a la higromicina de células HEK293 cotransfectadas con el plásmido auxiliar indicado y un donante de ADN (forma lineal) producido mediante el método de digestión con enzimas/acoplamiento;

20 La figura 1C es un histograma que muestra el número de colonias resistentes a la higromicina de células HEK293 cotransfectadas con el plásmido auxiliar indicado y un donante de ADN producido mediante un kit disponible en el mercado según el ejemplo 1 que aparece a continuación;

25 La figura 2A es un histograma que muestra el número de colonias resistentes a la higromicina de células T Jurkat cotransfectadas con el plásmido auxiliar indicado y un donante de ADN producido mediante el método de digestión con enzimas/acoplamiento;

La figura 2B es un histograma que muestra el número de colonias resistentes a la higromicina de células T Jurkat cotransfectadas con el plásmido auxiliar indicado y un donante de ADN producido mediante un kit disponible en el mercado según el ejemplo 2 que aparece a continuación; y

30 La figura 3 es un histograma que muestra la eficacia de transposición del donante de ADN indicado y un plásmido auxiliar cotransfectados en células T humanas primarias según el ejemplo 3 que aparece a continuación.

### Descripción detallada

35 Se pretende que la descripción detallada proporcionada a continuación en conexión con los dibujos adjuntos sea una descripción de los presentes ejemplos y no se pretende que represente las únicas formas en las que el presente ejemplo pueda construirse o utilizarse. La descripción indica las funciones del ejemplo y la secuencia de etapas para construir y ejecutar el ejemplo. Sin embargo, pueden lograrse las mismas funciones y secuencias, o funciones y secuencias equivalentes, mediante diferentes ejemplos.

#### 1. Definiciones

40 Por comodidad, ciertos términos y expresiones empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se recogen en este punto. A menos que se indique lo contrario, las terminologías científicas y técnicas empleadas en la presente descripción tendrán los significados que se entienden habitualmente y que emplean los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que los términos en singular incluyen sus formas en plural, y los términos en plural incluirán el singular. De modo específico, tal como se emplean en la presente y en las reivindicaciones, las formas en singular "el/la" y "un/una" incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se  
45 emplean en la presente y en las reivindicaciones, las expresiones "al menos uno" y "uno o más" tienen el mismo significado e incluyen uno, dos, tres o más.

Independientemente de que los parámetros e intervalos numéricos que indican el alcance amplio de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos ofrecidos en los ejemplos específicos se indican de la manera más  
50 precisa posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que surgen indefectiblemente de la desviación estándar que se encuentra en las respectivas mediciones del ensayo. Además, tal como se emplea en la presente, el término "aproximadamente" en general significa dentro del 10 %, 5 %, 1 % o 0,5 % de un intervalo o valor dado. Como alternativa, el término "aproximadamente" significa un error estándar aceptable del promedio, cuando lo consideren los expertos en la técnica. Fuera de los ejemplos de funcionamiento/trabajo, o a menos que se indique expresamente lo contrario, debe entenderse que todos los

intervalos numéricos, cantidades, valores y porcentajes, tales como los que aparecen para cantidades de materiales, duraciones de tiempo, temperaturas, condiciones de ejecución, proporciones de cantidades y similares descritos en la presente, están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la presente descripción y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar si se desea. Como mínimo, cada parámetro numérico debe considerarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y aplicando las técnicas de redondeo habituales.

Tal como se emplean en la presente, el término "transposón" o la expresión "elemento transponible" se refieren a un polinucleótido que es capaz de cambiar su posición dentro de un genoma mediante su escisión desde un polinucleótido donante (por ejemplo, un vector) e integrándose en un sitio diana (por ejemplo, un ADN extracromosómico o genómico de la célula). Un transposón es un polinucleótido que incluye una secuencia de ácido nucleico flanqueada por secuencias de nucleótidos de acción en cis; en el que al menos una secuencia de nucleótidos de acción en cis está colocada 5' a la secuencia de ácido nucleico, y al menos una secuencia de nucleótidos de acción en cis está colocada 3' a la secuencia del ácido nucleico. Las secuencias de nucleótidos de acción en cis incluyen al menos una repetición invertida ("inverted repeat", IR) en cada extremo del transposón, a la cual se une una transposasa, preferiblemente un miembro de la familia piggyBac de transposasas de mamífero. En ciertas realizaciones preferidas, el transposón es un micro-piggyBac de polilla.

Tal como se emplea en la presente, el término "transposasa" se refiere a un polipéptido que cataliza la escisión de un transposón de un polinucleótido donante, por ejemplo, una construcción de minicírculo, y la posterior integración del transposón en el ADN genómico o extracromosómico de una célula diana. Preferiblemente, la transposasa se une a una secuencia repetida invertida.

Tal como se emplea en la presente, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos de cualquier longitud. Así, por ejemplo, los términos péptido, oligopéptido, proteína, anticuerpo y enzima se incluyen dentro de la definición de polipéptido. El término "polipéptido" también incluye las modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, la glicosilación (por ejemplo, la adición de un sacárido), la acetilación, la fosforilación y similares.

El término "vector", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico a la cual se ha unido. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a bacterias, plásmidos, fagos, cósmidos, episomas, virus y fragmentos de ADN insertables, es decir, fragmentos capaces de ser insertados en el genoma de una célula huésped mediante recombinación homóloga.

Tal como se emplea en la presente, el término "plásmido" se refiere a un ADN bicatenario circular capaz de aceptar un fragmento de ADN extraño y capaz de replicarse en células procariotas o eucariotas.

El término "minicírculo" y las expresiones "minicírculo de ADN" y "secuencia de ácido nucleico de minicírculo" son intercambiables y se emplean para indicar una secuencia de ácido nucleico generalmente exenta de cualquier secuencia del esqueleto de un vector/plásmido necesaria para la replicación, tal como el gen de resistencia a antibióticos de procariotas y el origen de la replicación procariota. Los minicírculos pueden generarse *in vivo* a partir de plásmidos bacterianos mediante recombinación intramolecular específica de sitio entre los sitios de reconocimiento de recombinasa en el plásmido, produciendo un vector de minicírculo de ADN exento del ADN del esqueleto del plásmido bacteriano. Según una realización de la presente descripción, el presente minicírculo se prepara mediante el método de digestión con enzimas/acoplamiento. Según otra realización de la presente descripción, el presente minicírculo se prepara mediante un kit disponible en el mercado, concretamente, el kit Minicircle DNA Production (System Biosciences, CA, EE. UU.).

Tal como se emplea en la presente, el término "introducir" se refiere a la introducción de un polinucleótido (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de minicírculo o el vector auxiliar del presente sistema de transposón) en una célula o un organismo. El ácido nucleico del polinucleótido puede estar en forma de ARN o ADN desnudo, asociado con diversas proteínas, o incorporado en un vector. El término "introducir", tal como se emplea en la presente, pretende transmitir el significado más amplio posible e incluye la introducción, por ejemplo, mediante un método de transfección (introduciendo un polinucleótido en células eucariotas mediante un tratamiento físico y/o químico), un método de transformación (introduciendo un polinucleótido en células procariotas mediante un tratamiento físico y/o químico), un método viral/método de transducción viral (introduciendo un polinucleótido en células eucariotas y/o procariotas mediante un virus o un vector viral), un método de conjugación (introduciendo un polinucleótido desde una célula a otra mediante contacto directo entre las células o mediante un puente citoplásmico entre las células), y un método de fusión (fusionando dos células, que incluye la fusión de células homotípica y la fusión de células heterotípica).

El término "modificar", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier manipulación de una célula que produzca un cambio detectable en la célula, y la manipulación incluye, pero no se limita a insertar un polinucleótido y/o un polipéptido heterólogo/homólogo a la célula, y mutar un polinucleótido y/o un polipéptido nativo a la célula.

El término "transposición", tal como se emplea en la presente, se refiere a un proceso de redistribución genética complejo que implica el movimiento o el copiado de un polinucleótido (transposón) desde una localización y su inserción en otra, que a menudo se produce dentro de un genoma, o entre genomas, construcciones de ADN (tales como plásmidos, bácmidos y cósmidos) o genoma y construcciones de ADN. Según las realizaciones de la presente descripción, la transposición se produce entre el genoma y la construcción de ADN, en el que el polinucleótido (por ejemplo, el módulo de expresión del presente sistema de transposón) se transfiere desde la secuencia de minicírculo de ácido nucleico del presente sistema de transposón al genoma de células huésped (por ejemplo, las células inmunitarias).

La expresión "eficacia de transposición", tal como se emplea en la presente, se refiere al número de células huésped que contienen el polinucleótido introducido, dentro de una población de células huésped. En general, la eficacia de transposición puede determinarse transfecando un polinucleótido que codifica un gen indicador, por ejemplo,  $\beta$ -gal, a una población de células huésped. Por tanto, la eficacia de transfección puede determinarse ensayando el producto génico codificado por el polinucleótido introducido, por ejemplo, midiendo el número de células que tienen actividad  $\beta$ -gal. Según una realización de la presente descripción, el polipéptido introducido es un gen de resistencia a la higromicina y, por consiguiente, la eficacia de transposición puede determinarse midiendo el número de células resistentes a la higromicina.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "célula inmunitaria" se refiere a células que desempeñan un papel en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias son de origen hematopoyético e incluyen linfocitos, tales como células B y células T; células asesinas naturales; células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

La expresión "enfermedad relacionada con la inmunidad", tal como se emplea en la presente, se refiere a una enfermedad y/o afección en la que el sistema inmunitario está implicado en la patogénesis de la enfermedad, o en la que una estimulación o inhibición apropiada del sistema inmunitario puede dar como resultado un tratamiento y/o una protección frente a la enfermedad. Los ejemplos de enfermedad relacionada con la inmunidad que pueden tratarse mediante la presente invención incluyen, pero no se limitan a un tumor, una enfermedad infecciosa, una alergia, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad del injerto contra el huésped, o una enfermedad inflamatoria.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, que incluye la especie humana, que puede tratarse con los métodos de la presente invención. El término "sujeto" pretende indicar el género masculino y femenino, a menos que se indique específicamente un género.

## 2. Descripción de la invención

En general, la presente descripción se refiere a sistemas, métodos y/o kits para modificar células para que porten genes de interés (por ejemplo, genes de proteínas terapéuticas). Las células modificadas después se usan como agente terapéutico para tratar un paciente que está padeciendo una enfermedad y/o trastorno que puede tratarse mediante los productos de los genes de interés.

Tal como se mencionó anteriormente, se proporciona un método *in vitro* para integrar una secuencia de ADN exógeno en el genoma de una célula. La secuencia de ADN exógeno puede codificar una proteína de resistencia a un antibiótico, un ARNip, una proteína indicadora, una citoquina, una quinasa, un antígeno, un receptor específico de antígeno, un receptor de citoquinas, o un polipéptido suicida. Por ejemplo, la secuencia de ADN exógeno puede codificar un receptor específico para un antígeno asociado a tumor. Una célula T modificada mediante el método es capaz de reconocer y matar específicamente las células tumorales que expresan el antígeno asociado a tumor. En otro ejemplo, la secuencia de ADN exógeno codifica una proteína de resistencia a la higromicina, de modo que puede establecerse una línea celular resistente a la higromicina. Como alternativa, la secuencia de ADN exógeno puede no poseer ninguna función biológica y puede emplearse para interrumpir la función de otro gen insertándose ella misma en un gen esencial, interrumpiendo con ello su función. Por ejemplo, la secuencia de ADN exógeno puede codificar un ARN antisentido para el silenciamiento de genes de receptor específico de células T ("T cell specific receptor", TCR) o PD-1.

El método descrito anteriormente se realiza obteniendo, en primer lugar, un sistema de transposón.

El sistema de transposón incluye un primer vector que contiene una primera repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:1, una secuencia de ADN exógeno cadena abajo de la primera repetición invertida, y una segunda repetición invertida cadena abajo de la secuencia de ADN exógeno, teniendo la segunda repetición invertida una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:2. El primer vector puede incluir además un promotor no procariota unido operativamente a la secuencia de ADN exógeno. El promotor no procariota puede ser, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6. Como ejemplo, el primer vector incluye además un potenciador, un silenciador o un aislante.

Según la invención, el primer vector es un minicírculo de ADN que carece de las secuencias procariotas requeridas para la replicación bacteriana. El minicírculo de ADN puede tener una longitud de 500-1.500 pb exclusivas de la secuencia de ADN exógeno. Por ejemplo, el minicírculo de ADN puede tener una longitud de 700-1.200 pb o de 800-1.000 pb exclusivas de la secuencia de ADN exógeno.

- 5 En general, el ADN procariota se considera un antígeno estimulante de la inmunidad, que puede suscitar una respuesta inmunitaria en un huésped que conduzca a una disminución en la eficacia de expresión del ADN exógeno portado por el primer vector. Por consiguiente, la falta de secuencias procariotas en el minicírculo de ADN hace que el presente sistema de transposón sea más eficaz en términos de introducir y expresar el ADN exógeno en una célula huésped, por ejemplo, una célula eucariota, en comparación con otros sistemas de transposón/expresión que incluyen secuencias de ADN procariota. Además, el sistema de transposón descrito anteriormente tiene un tamaño menor en comparación con el tamaño de los sistemas de transposón/expresión típicos, debido a la ausencia de secuencia de ADN procariota en el minicírculo de ADN.

15 El sistema de transposón también incluye un segundo vector, concretamente, un plásmido auxiliar que contiene un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una transposasa. La transposasa reconoce y se une a la primera repetición invertida y la segunda repetición invertida en el primer vector. La transposasa puede ser, por ejemplo, ThyPLGMH, mycPBasa, TPLGMH o HAhyPBasa. En una realización concreta, la transposasa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, que es codificada por SEQ ID NO:3. El vector auxiliar puede prepararse según métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Yaa-Jyuhn James Meir *et al.* (A versatile, highly efficient, and potentially safer piggyBac transposon system for mammalian genome manipulations, FASEB, 2013:27, 4429-4443).

20 El promotor en el segundo vector se selecciona del promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6. En una realización concreta, el promotor es el promotor de citomegalovirus.

25 Para realizar el método, el primer vector y el segundo vector se introducen en una célula. Esto puede lograrse usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, nucleofección, compresión de células ("cell squeezing", compresión suave de la membrana celular), sonoporación (induce la formación de poros en la membrana celular mediante ultrasonido de alta intensidad), transfección óptica (se genera un orificio diminuto en la membrana celular mediante un láser muy enfocado), impalefección (se inserta en una célula ADN unido a la superficie de una nanofibra), pistola de genes (se "dispara" al núcleo celular ADN acoplado a una nanopartícula de un sólido inerte), magnetofección (emplea la fuerza magnética para transportar ADN hacia el interior de las células diana), transducción viral (emplea virus como portadores para transportar ADN hacia el interior de las células diana), o transfección a través de un dendrímero, un liposoma, o un polímero catiónico. En un ejemplo, el sistema de transposón se introduce en una célula a través de un método químico no liposómico, concretamente, transfección FuGENE® HD. En otro ejemplo, el sistema de transposón se introduce en una célula mediante nucleofección. En una realización concreta del método, el primer vector del sistema de transposón se linealiza, por ejemplo, usando una enzima de restricción, antes de introducirlo en una célula.

35 El primer vector y el segundo vector se introducen en la célula en una proporción que varía de 2:1 a 1:1 en peso. Según una realización, el ADN exógeno se introduce en una célula epitelial, y la proporción entre el primer vector, por ejemplo, minicírculo de ADN, y el segundo vector es de 2:1 a 1:1 en peso. Según otra realización, el ADN exógeno se introduce en una célula T inmortal, y la proporción entre la secuencia de minicírculo de ADN y el vector auxiliar es de aproximadamente 2:1 a 1:1 en peso. En otra realización, el ADN exógeno se introduce en una célula T primaria, y la proporción entre la secuencia de minicírculo de ADN y el vector auxiliar es de aproximadamente 2:1 a 1:1 en peso.

40 La secuencia del ADN exógeno se integra en el genoma de la célula en virtud de la transposasa, que es expresada en la célula por el segundo vector y cataliza la escisión de la secuencia de ADN exógeno desde el primer vector y la integración del ADN exógeno escindido en el genoma de la célula.

La célula usada en el anterior método puede ser una célula inmunitaria. De modo más específico, la célula inmunitaria puede ser una célula T, una célula B, una célula dendrítica, un macrófago o un mastocito.

45 En otro aspecto, la célula es una célula madre. La célula madre puede derivarse, por ejemplo, de médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o pulpa dental. En un método concreto, la célula es una célula humana.

50 Para realizar el anterior método, se proporciona un kit para integrar una secuencia de ADN exógeno en el genoma de una célula. El kit contiene un recipiente, que comprende el presente sistema de transposón descrito anteriormente, y unas instrucciones asociadas con el recipiente y que indican cómo usar el presente sistema de transposón. Tal como se mencionó anteriormente, el presente sistema de transposón incluye un primer y un segundo vector.

El primer vector incluye una primera repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:1, una segunda repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:2 cadena abajo de la primera repetición invertida, y un sitio de clonación entre la primera repetición invertida y la segunda repetición invertida para introducir una secuencia de ADN exógeno.

- 5 El primer vector en el kit puede incluir además un promotor no procariota cadena abajo de la primera repetición invertida y cadena arriba del sitio de clonación. El ADN exógeno puede insertarse en el sitio de clonación de modo que el promotor no procariota esté unido operativamente a la secuencia de ADN exógeno. El promotor no procariota puede ser, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el  
10 promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6. En un ejemplo, el primer vector incluye además un potenciador, un silenciador o un aislante.

- El kit también incluye un segundo vector, concretamente, un plásmido auxiliar que contiene un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una transposasa. La transposasa puede ser, por ejemplo, ThyPLGMH, mycPBasa, TPLGMH o HAhyPBasa. En una realización concreta, la transposasa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.  
15

- El segundo vector en el kit, al igual que el segundo vector usado en el método *in vitro* indicado anteriormente en la presente, contiene un promotor seleccionado del promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6. En una realización concreta, el promotor es el promotor de citomegalovirus.  
20

Tal como se emplea en la presente, "instrucciones" incluye un panfleto, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión (por ejemplo, cinta, CD, VCD o DVD) que pueda usarse para comunicar o enseñar al usuario a utilizar el presente sistema de transposón. Las instrucciones pueden fijarse al recipiente o se envasan independientemente del recipiente que comprende el presente sistema de transposón.

- 25 El kit descrito en la presente puede incluir además una disolución tampón para estabilizar el sistema de transposón y/o para realizar la transfección de células. Las disoluciones tampón pueden ser, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato, disolución salina con base de Tris, tampón Tris-EDTA, tampón ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetsulfónico, o tampón ácido (N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfónico (BES).

- 30 Tal como se mencionó anteriormente, se describe un método para tratar un sujeto que padece o que se sospecha que padece una enfermedad relacionada con la inmunidad. El método incluye modificar células con la ayuda del kit descrito anteriormente para transportar un gen adecuado para el tratamiento de la enfermedad relacionada con la inmunidad, y administrar una cantidad eficaz de las células modificadas para el tratamiento de la enfermedad relacionada con la inmunidad. En un ejemplo, el gen es un receptor de antígeno quimérico ("chimeric antigen receptor", CAR) contra CD19 para modificar células T CAR para tratar la leucemia linfoblástica aguda.

- 35 El sujeto que padece o que se sospecha que padece una enfermedad relacionada con la inmunidad es un animal mamífero, que incluye un ser humano, un ratón, una rata, un conejo, un mono y un cerdo. En un aspecto específico, el sujeto es un ser humano. En el caso en que el sujeto que se está tratando sea un ser humano, la célula inmunitaria introducida/transferida del presente método se deriva preferiblemente del propio sujeto. Como alternativa, la célula inmunitaria introducida/transferida del presente método se deriva de un donante.

- 40 Según algunos aspectos de la presente descripción, el presente método es útil para tratar una enfermedad de inmunosupresión, tal como un tumor o una enfermedad infecciosa. En estas realizaciones, el presente sistema de transposón puede comprender un gen potenciador de la inmunidad para potenciar la respuesta inmunitaria en el sujeto.

- 45 Según otros aspectos de la presente descripción, el presente método es útil para tratar una enfermedad provocada por una respuesta inmunitaria hiperactiva (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria) o una respuesta inmunitaria inapropiada (por ejemplo, alergia, enfermedad del injerto contra el huésped, o una enfermedad inflamatoria). En los aspectos, el presente sistema de transposón que comprende un gen inmunosupresor es capaz de inhibir la respuesta inmunitaria en el sujeto.

- 50 Los siguientes ejemplos se proporcionan para aclarar ciertos aspectos de la presente invención y para ayudar a los expertos en la técnica a practicar la invención. Estos ejemplos no deben considerarse de ninguna manera que limiten el alcance de la invención.

## Ejemplos

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se usaron la línea de células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293), linfocitos T inmortales JK humanos (T Jurkat) y células T humanas primarias en el presente estudio. Las células HEK293 se cultivaron en medio MEM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, 1x penicilina/estreptomicina, y piruvato de sodio 1 mM. Las células T Jurkat y las células T humanas primarias se cultivaron en medio RPMI1640 que contenía L-glutamina 2 mM, FBS al 10 %, piruvato de sodio 1 mM, y aminoácidos no esenciales 0,1 mM. Todas las células se mantuvieron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Producción del medio acondicionado

Las células Jurkat se cultivaron en un medio fresco a una densidad de  $2 \times 10^6$ /mL durante 24 h, después el medio de cultivo se recogió, se filtró y se usó como el medio acondicionado.

10 Generación de plásmidos y/o construcciones de expresión

*pBS-módulo*

El fragmento de ADN que contiene el gen de resistencia a higromicina conducido por el promotor de SV40 se escindió del vector pcDNA3.1\_hygro\_LacZ (Invitrogen). Después de una digestión con XmnI y SapI, el fragmento de ADN se clonó en el sitio SmaI de pBlueScript SKII para completar la construcción de pBS-hygro. Para insertar también el gen de resistencia a kanamicina y el origen de la replicación ColE1, el fragmento Apol\_AflIII de pZerO-2.1 (Invitrogen) se clonó en el sitio EcoRV de pBS-hygro para completar la construcción del pBS-módulo.

*mini-piggyBac\_largo*

El pBS-módulo se digirió con las enzimas de restricción SmaI y EcoRV, seguido de la inserción del fragmento digerido en pXLBacIIpUbnIsEGFP, que se deriva de pBSII-ITR1. La construcción producida de este modo, mini-piggyBac\_largo, tiene repeticiones terminales (TR) de 308 pb y 238 pb en sus extremos 5' y 3', respectivamente.

La forma lineal de mini-piggyBac\_largo se prepara digiriendo el mini-piggyBac\_largo con XmnI.

*mini-piggyBac\_corto*

La construcción mini-piggyBac\_largo se digirió con PciI y AclI, se rellenó con Klenow (NE Biolabs) y se autoacopló con ADN ligasa T4 (NE Biolabs) para producir mini-piggyBac\_corto, que no contiene el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de la replicación f1.

La forma lineal de mini-piggyBac\_corto se prepara digiriendo el mini-piggyBac\_corto con Bgl I.

*micro-piggyBac\_largo*

Se obtuvieron los dominios de repetición terminales ("terminal repeat domains", TRD) de piggyBac corto (concretamente, 746~808 3' LTR y 1426~1460 5' LTR como en pXL-BacII) a partir de una mezcla de PCR que consistía en las siguientes parejas de cebadores: pB-11-KpnI (SEQ ID NO:5), pB-5-directo (SEQ ID NO:6), pB-6-inverso (SEQ ID NO:7), y pB-12-SacI (SEQ ID NO:8). El amplicón resultante que contenía ambos TRD 67 pb 5' y 40 pb 3' con sitios de restricción SwaI y Xho I intermedios se clonó en pBS-SKII a través de los sitios de restricción Kpn I y Sac I para obtener pPBendAATT. El módulo de expresión obtenido del pBS-módulo descrito anteriormente se insertó entre los TRD de piggyback corto en pPBendAATT a través del sitio Xho I con extremos romos para producir micro-piggyBac\_largo.

La forma lineal de micro-piggyBac\_largo se prepara digiriendo el micro-piggyBac\_largo con XmnI.

*micro-piggyBac\_corto*

El micro-piggyBac\_largo se digirió con Acc65I y AflIII para eliminar el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de la replicación f1. Se formaron extremos romos en el fragmento de ADN remanente, seguido de un autoacoplamiento para generar la construcción de micro-piggyBac\_corto, que no contiene el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de la replicación f1. Esta construcción también se denomina módulo de minicírculo.

La forma lineal de micro-piggyBac\_corto se prepara digiriendo micro-piggyBac\_corto con XmnI.

*Minicírculo-microPB-módulo*

Como alternativa, el micro-piggyBac\_corto, es decir, el módulo de minicírculo, puede prepararse usando el kit de producción de microcírculos de ADN MC-Easy Circle. En este método, el micro-piggyBac\_largo se digirió con KpnI, SacI y XmnI, se formaron extremos romos en el fragmento KpnI-SacI (3993 pb) que contiene las repeticiones invertidas izquierda (microL) y derecha (microR) de micro-piggyBac y se insertó en el sitio EcoRV de pMC.BESPX-MCS1 para producir pMC-microPB-módulo. El microcírculo-microPB-módulo se preparó a partir de pMC-microPB-módulo usando el kit de producción de microcírculos de ADN MC-Easy Circle siguiendo el protocolo del fabricante. El minicírculo-microPB-módulo producido de esta forma no contiene el gen de resistencia a la ampicilina y el origen

de la replicación f1.

*Plásmido auxiliar*

Los plásmidos auxiliares pCMV-ThyPLGMH, pCMV-mycPBasa, pCMV-TPLGMH y pCMV-HAhyPBasa se construyeron según el protocolo descrito en Yaa-Jyuhn James Meir *et al.* (A versatile, highly efficient, and potentially safer piggyBac transposon system for mammalian genome manipulations, FASEB, 2013:27, 4429-4443).

Ensayos de transposición

*Células HEK293*

Se recolectaron células al 80 % de confluencia y se sembraron en pocillos individuales de placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo 18 horas antes de la transfección. Para cada transfección, un total de 300 ng de mezcla de ADN se transfectó usando Fugene 6 (Roche, Florencia, SC). Cada mezcla de ADN contenía 100 ng de plásmido auxiliar (concretamente, pCMV-ThyPLGMH, pCMV-mycPBasa, pCMV-TPLGMH o pCMV-HAhyPBasa), diversas cantidades de donante de ADN (concretamente, mini-piggyBac\_largo, mini-piggyBac\_corto, micro-piggyBac\_largo, micro-piggyBac\_corto, pMC-microPB-módulo o minicírculo-microPB-módulo; la cantidad del donante más pequeño se ajustó a 100 ng) y pcDNA3.1 para un total de 300 ng de ADN. Para cada reacción de transfección, una quinta parte de las células transfectadas se trasladaron a placas de 100 mm, seguido de una selección con higromicina durante 14 días. Para contar los clones, las células se fijaron con PBS que contenía paraformaldehído al 4 % durante 10 min y después se tiñeron con azul de metileno al 0,2 % durante 1 hora. Después de 14 días de selección con higromicina, solo se contaron las colonias con un diámetro de 0,5 mm.

*Células T Jurkat*

Las células se sembraron a  $1 \times 10^6$ /mL 24 horas antes de la nucleofección. Para cada reacción de nucleofección, se usó un total de 6 µg de ADN para transfectar  $1 \times 10^6$  células. Cada mezcla de ADN contenía 2,5 µg de plásmido auxiliar (concretamente, pCMV-ThyPLGMH, pCMV-mycPBasa, pCMV-TPLGMH o pCMV-HAhyPBasa), diversas cantidades de donante de ADN (concretamente, mini-piggyBac\_largo, mini-piggyBac\_corto, micro-piggyBac\_largo, micro-piggyBac\_corto, pMC-microPB-módulo o minicírculo-microPB-módulo; la cantidad del donante más pequeño se ajustó a 2,0 µg) y pcDNA3.1 para un total de 6 µg de ADN. Veinticuatro horas después de la nucleofección, 30 células vivas en 50 µL del medio acondicionado descrito anteriormente con 1,2 mg de higromicina se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Cada dos a tres días, se añadió suavemente un volumen igual de medio acondicionado a cada pocillo sin alterar los agrupamientos de células. Para cada reacción, un total de 10.200 células vivas se sometieron a una selección con higromicina. Se determinó la actividad de transposición contando el número total de agrupamientos de células para cada reacción bajo un microscopio óptico 6 o 7 días después de la selección con higromicina.

*Células T primarias*

Un día antes de la nucleofección, se descongelaron células primarias humanas (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) en medio RPMI completo. Después de un cultivo durante la noche, las células se recolectaron y se sometieron a nucleofección. Para cada reacción de nucleofección, se usó un total de 2,2 µg de ADN para transfectar  $1 \times 10^5$  células en 20 µl de tampón de nucleofección ALL-IN-ONE (GF1001, GenomeFrontier, Biosciences). Cada mezcla de ADN contenía 0,8 µg de plásmido auxiliar (concretamente, pCMV-HAhyPBasa o pCMV-ThyPLGMH), diversas cantidades de plásmido donante (concretamente, mini-piggyBac\_largo, mini-piggyBac\_corto, micro-piggyBac\_largo o micro-piggyBac\_corto; la cantidad del donante más grande se ajustó a 1,4 µg) y pcDNA3.1 para una cantidad total de 2,2 µg de ADN. Veinticuatro horas después de la nucleofección, el total de células transfectadas en cada reacción se cultivó en 500 µl de medio RPMI 1640 completo con la adición de estímulos (IL-2 (50 µg/ml) y PHA) e higromicina (1,0 mg/ml). Se determinó la actividad de transposición contando el número total de células supervivientes 22 días después de la selección con higromicina.

Ejemplo 1: Actividad de transposición en células HEK293

En este ejemplo, se analizan las actividades de transposición de donantes de ADN y del plásmido auxiliar. Los resultados se muestran en las figuras 1A-1C.

Tal como se muestra en la figura 1A, independientemente del donante de ADN que fuera cotransfectado, las células transfectadas con pCMV-ThyPLGMH fueron células más resistentes a la higromicina, en comparación con las transfectadas con pcDNA3.1, pCMV-TPLGMH o pCMV-mycPBasa. Los datos indican que ThyPLGMH mostró la actividad de transposición más potente entre las transposasas ensayadas. Con respecto al donante de ADN, los cuatro donantes de ADN (concretamente, mini-piggyBac\_largo, mini-piggyBac\_corto, micro-piggyBac\_largo y micro-piggyBac\_corto) mostraron una actividad de transposición similar en células HEK293 (figura 1A). De forma sorprendente, cuando los donantes de ADN se transfectaron en células HEK293 en su forma linealizada, la actividad de transposición de micro-piggyBac (concretamente, micro-piggyBac\_corto o micro-piggyBac\_largo) fue obviamente mayor que la de mini-piggyBac (concretamente, mini-piggyBac\_corto o mini-piggyBac\_largo) (figura 1B), y micro-piggyBac\_corto mostró la actividad de transposición más potente.

La actividad de transposición se examinó más a fondo usando el minicírculo preparado con el kit de producción de microcírculos de ADN MC-Easy Circle. Los datos que se muestran en la figura 1C indican que la actividad de minicírculo-microPB-módulo fue aproximadamente 2,7 veces mayor que la de pMC-microPB-módulo cuando se cotransfectan con pCMV-ThyPLGMH.

5 Tomados conjuntamente, estos datos indican que la actividad de transposición disminuye a medida que aumenta la longitud total o el TRD del donante de ADN, y que ThyPLGMH posee una actividad de transposición más alta que otras transposasas ensayadas. Por consiguiente, en comparación con otros donantes de ADN y plásmidos auxiliares, la combinación de pCMV-ThyPLGMH y minicírculo de micro-piggyBac (concretamente, micro-piggyBac\_corto o minicírculo-microPB-módulo) produjo la eficacia de transposición más alta en células HEK293.

10 Ejemplo 2: Actividad de transposición en células T Jurkat

La actividad de transposición de pCMV-ThyPLGMH y minicírculo de micro-piggyBac se examinó más a fondo en células T Jurkat. Los resultados se muestran en las figuras 2A-2B.

15 Tal como se muestra en la figura 2A, el número de colonias resistentes a la higromicina obtenidas a partir de las células cotransfectadas con pCMV-ThyPLGMH y micro-piggyBac\_corto fue significativamente mayor que a partir de las células cotransfectadas con otros donantes de ADN y plásmidos auxiliares.

De modo similar al descubrimiento mostrado en la figura 1C, la combinación de pCMV-ThyPLGMH y minicírculo-microPB-módulo produjo la mayor eficacia de transposición, en comparación con otras combinaciones de donante de ADN/plásmido auxiliar (figura 2B).

Ejemplo 3: Actividad de transposición en células T humanas primarias

20 Además de las líneas celulares descritas anteriormente, concretamente células HEK293 y células T Jurkat, se analizó más a fondo la actividad de transposición de donantes de ADN y plásmidos auxiliares específicos en células T humanas primarias.

25 Tal como se muestra en la figura 3, se observó la mejor actividad de transposición en células T primarias humanas en células transfectadas con pCMV-ThyPLGMH con la forma corta o larga de micro-piggyBac, es decir, micro-piggyBac\_corto o micro-piggyBac\_largo.

30 En conclusión, la presente descripción proporciona un sistema de transposón y un método para integrar un gen exógeno en el genoma de una célula, en especial en una célula inmunitaria. En comparación con las combinaciones de otros donantes de ADN y plásmidos auxiliares, la combinación de pCMV-ThyPLGMH y minicírculo de micro-piggyBac (producido mediante el método de digestión con enzimas/acoplamiento (concretamente, micro-piggyBac\_corto) o producido mediante el kit de producción de minicírculos de ADN MC-Easy Circle (concretamente, minicírculo-microPB-módulo) o micro-piggyBac\_largo produciría la eficacia de transposición más alta. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un medio potencial para tratar diferentes enfermedades (por ejemplo, una enfermedad relacionada con la inmunidad) a través del transporte eficaz de un gen terapéutico al interior del sujeto que lo necesita.

35

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> WU Sareina Chiung-Yuan	
	<120> SISTEMA DE TRANSPOSÓN, KIT QUE LO COMPRENDE Y SUS USOS	
	<130> P2904-PCT	
10	<150> US62/267,270	
	<151> 14-12-2015	
	<160> 8	
15	<170> BiSSAP 1.3	
	<210> 1	
	<211> 67	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética-5-IR	
25	<400> 1	
	ttaaccttag aaagataatc atattgtgac gtacgttaa gataatcatg cgtaaaattg	60
	acgcatg	67
	<210> 2	
	<211> 40	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética-3-IR	
35	<400> 2	
	gcatgctca atttacgca gactatctt ctagggttaa	40
	<210> 3	
40	<211> 2697	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> secuencia sintética-ThyPLGMH	
	<400> 3	
	atgggtcga agaaacgtcg ccaacgtcgc cgtccgccta tcatgactcg agccatgggc	60
	agcagcctgg acgacgagca catcctgagc gccctgctgc agagcgacga cgagctggtc	120
	ggcgaggaca gcgacagcga ggtgagcgac cacgtgagcg aggacgacgt gcagtccgac	180
	accgaggagg ccttcatcga cgaggtgcac gaggtgcagc ctaccagcag cggctccgag	240
	atcctggacg agcagaacgt gatcgagcag cccggcagct ccctggccag caacaggatc	300
	ctgacctcgc cccagaggac catcaggggc aagaacaagc actgctggtc cacctccaag	360
	cccaccaggc ggagcagggt gtccgccctg aacatcgtga gaagccagag gggccccacc	420

ES 2 870 907 T3

aggatgtgca ggaacatcta cgaccccctg ctgtgcttca agctgttctt caccgacgag 480  
 atcatcagcg agatcgtgaa gtggaccaac gccgagatca gcctgaagag gcgggagagc 540  
 atgacctccg ccaccttcag ggacaccaac gaggacgaga tctacgcctt cttcggcatc 600  
 ctggtgatga ccgccgtgag gaaggacaac cacatgagca ccgacgacct gttcgacaga 660  
 tccctgagca tgggtgtacgt gagcgtgatg agcagggaca gattcgactt cctgatcaga 720  
 tgcctgagga tggacgacaa gagcatcagg cccaccctgc gggagaacga cgtgttcacc 780  
 cccgtgagaa agatctggga cctgttcac caccagtgc tccagaacta caccctggc 840  
 gccacacatga ccacgacga gcagctgctg ggcttcaggg gcaggtgcc cttcagggtc 900  
 tataatccca acaagcccag caagtacggc atcaagatcc tgatgatgtg cgacagcggc 960  
 accaagtaca tgatcaacgg catgccctac ctgggcaggg gcacccagac caacggcgtg 1020  
 cccctgggcg agtactacgt gaaggagctg tccaagcccg tccacggcag ctgcagaaac 1080  
 atcacctgcg acaactggtt caccagcatc cccctggcca agaacctgct gcaggagccc 1140  
 tacaagctga ccatcgtggg caccgtgaga agcaacaaga gagagatccc cgaggtcctg 1200  
 aagaacagca ggtccaggcc cgtgggcacc agcatgttct gcttcgacgg ccccctgacc 1260  
 ctggtgtcct acaagcccaa gcccgccaag atggtgtacc tgctgtccag ctgcgacgag 1320  
 gacgccagca tcaacgagag caccggcaag cccagatgg tgatgtacta caaccagacc 1380  
 aagggcggcg tggacaccct ggaccagatg tgcagcgtga tgacctgcag cagaaagacc 1440  
 aacaggtggc ccatggccct gctgtacggc atgatcaaca tcgcctgcat caacagcttc 1500  
 atcatctaca gccacaacgt gagcagcaag ggcgagaagg tgcagagccg gaaaaagttc 1560  
 atgcggaacc tgtacatggg cctgacctcc agcttcatga ggaagaggct ggaggccccc 1620  
 accctgaaga gatacctgag ggacaacatc agcaacatcc tgcccaaaga ggtgccggc 1680  
 accagcgacg acagcaccga ggagcccgtg atgaagaaga ggacctactg cacctactgt 1740  
 cccagcaaga tcagaagaaa ggccagcgcc agctgcaaga agtctaaga ggtcatctgc 1800  
 cgggagcaca acatcgacat gtgccagagc tgtttcaagc ttaagttggg cggcggcgcc 1860  
 cccgccgtgg gcggcgggcc caaggccgcg gataaaccgg tcgccacat ggtgagcaag 1920  
 ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac 1980  
 ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc 2040  
 ctgaagtta tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc 2100  
 ctgacctacg gcgtgcagt cttcagccgc taccccgacc acatgaagca gcacgacttc 2160  
 ttcaagtccg ccatgcccga aggtacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac 2220  
 ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag ttogagggcg acaccctggt gaaccgcatc 2280

ES 2 870 907 T3

gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac 2340  
aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg 2400  
aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga cactaccag 2460  
cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc 2520  
cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc 2580  
gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagcttgg gcccgaaaca 2640  
aaactcatct cagaagagga tctgaatagc gccgtogacc atcatcatca tcatcat 2697

<210> 4  
<211> 899  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> secuencia sintética-ThyPLGMH

<400> 4  
Met Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Ile Met Thr  
1 5 10 15  
Arg Ala Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu  
20 25 30  
Leu Gln Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Val  
35 40 45  
Ser Asp His Val Ser Glu Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala  
50 55 60  
Phe Ile Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu  
65 70 75 80  
Ile Leu Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala  
85 90 95  
Ser Asn Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn  
100 105 110  
Lys His Cys Trp Ser Thr Ser Lys Pro Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser  
115 120 125  
Ala Leu Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg  
130 135 140  
Asn Ile Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu  
145 150 155 160  
Ile Ile Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys  
165 170 175  
Arg Arg Glu Ser Met Thr Ser Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp  
180 185 190  
Glu Ile Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys  
195 200 205  
Asp Asn His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met  
210 215 220  
Val Tyr Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg  
225 230 235 240  
Cys Leu Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn  
245 250 255  
Asp Val Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln  
260 265 270  
Cys Ile Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln  
275 280 285  
Leu Leu Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Val Tyr Ile Pro Asn  
290 295 300  
Lys Pro Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly

ES 2 870 907 T3

305					310					315				320	
Thr	Lys	Tyr	Met	Ile	Asn	Gly	Met	Pro	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln
				325					330					335	
Thr	Asn	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys
			340					345						350	
Pro	Val	His	Gly	Ser	Cys	Arg	Asn	Ile	Thr	Cys	Asp	Asn	Trp	Phe	Thr
		355					360					365			
Ser	Ile	Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Lys	Leu	Thr
	370					375					380				
Ile	Val	Gly	Thr	Val	Arg	Ser	Asn	Lys	Arg	Glu	Ile	Pro	Glu	Val	Leu
385					390					395					400
Lys	Asn	Ser	Arg	Ser	Arg	Pro	Val	Gly	Thr	Ser	Met	Phe	Cys	Phe	Asp
				405					410					415	
Gly	Pro	Leu	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Lys	Pro	Lys	Pro	Ala	Lys	Met	Val
			420					425					430		
Tyr	Leu	Leu	Ser	Ser	Cys	Asp	Glu	Asp	Ala	Ser	Ile	Asn	Glu	Ser	Thr
	435					440						445			
Gly	Lys	Pro	Gln	Met	Val	Met	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Thr	Lys	Gly	Gly	Val
	450					455					460				
Asp	Thr	Leu	Asp	Gln	Met	Cys	Ser	Val	Met	Thr	Cys	Ser	Arg	Lys	Thr
465					470					475					480
Asn	Arg	Trp	Pro	Met	Ala	Leu	Leu	Tyr	Gly	Met	Ile	Asn	Ile	Ala	Cys
				485					490					495	
Ile	Asn	Ser	Phe	Ile	Ile	Tyr	Ser	His	Asn	Val	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu
			500					505					510		
Lys	Val	Gln	Ser	Arg	Lys	Lys	Phe	Met	Arg	Asn	Leu	Tyr	Met	Gly	Leu
	515						520						525		
Thr	Ser	Ser	Phe	Met	Arg	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Pro	Thr	Leu	Lys	Arg
	530					535					540				
Tyr	Leu	Arg	Asp	Asn	Ile	Ser	Asn	Ile	Leu	Pro	Lys	Glu	Val	Pro	Gly
545					550					555					560
Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Thr	Glu	Glu	Pro	Val	Met	Lys	Lys	Arg	Thr	Tyr
				565					570					575	
Cys	Thr	Tyr	Cys	Pro	Ser	Lys	Ile	Arg	Arg	Lys	Ala	Ser	Ala	Ser	Cys
			580					585					590		
Lys	Lys	Cys	Lys	Lys	Val	Ile	Cys	Arg	Glu	His	Asn	Ile	Asp	Met	Cys
		595					600					605			
Gln	Ser	Cys	Phe	Lys	Leu	Lys	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	Val	Gly
	610					615					620				
Gly	Gly	Pro	Lys	Ala	Ala	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys
625					630					635					640
Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp
				645					650					655	
Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly
			660				665					670			
Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly
		675					680					685			
Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly
	690					695					700				
Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe
705					710					715					720
Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe
				725					730					735	
Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu
		740					745						750		
Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys
		755					760					765			
Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser
	770					775					780				
His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val
785					790					795					800
Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala
				805					810					815	

ES 2 870 907 T3

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu  
 820 825 830  
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro  
 835 840 845  
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala  
 850 855 860  
 Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Gly Pro Glu Gln  
 865 870 875 880  
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His  
 885 890 895  
 His His His

- 5 <210> 5  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
  
- 10 <220>  
 <223> secuencia sintética-pB-11-KpnI  
 <400> 5  
 atcgggtacc ttaaccctag aaagataatc atattg 36
  
- 15 <210> 6  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
  
- 20 <220>  
 <223> secuencia sintética -pB-5-directo  
 <400> 6  
 ggtaccccct agaagataa tcatattgtg acgtacgta aagataatca tgcgtaaaat 60  
 tgacgcatgc tcgag 75
  
- 25 <210> 7  
 <211> 76  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
  
- 30 <220>  
 <223> secuencia sintética-pB-6-inverso  
 <400> 7  
 gagctcccct agaagatag tctgcgtaaa attgacgcat gccaccgcgg tggatttaaa 60  
 tctcgagcat gcgtca 76
  
- 35 <210> 8  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
  
- 40 <220>  
 <223> secuencia sintética-pB-12-SacI  
 <400> 8  
 cgatgagctc ttaaccctag aaagatagtc tgcg 34
  
- 45

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método *in vitro* para integrar una secuencia de ADN exógeno en el genoma de una célula, comprendiendo dicho método:

(i) obtener un sistema de transposón que incluye

5 un primer vector que contiene:

una primera repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:1,

la secuencia de ADN exógeno cadena abajo de la primera repetición invertida, y

una segunda repetición invertida cadena abajo de la secuencia de ADN exógeno, teniendo la segunda repetición invertida una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:2, y

10 un segundo vector que contiene un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una transposasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4; y

(ii) introducir el primer vector y el segundo vector en la célula,

por lo que la secuencia de ADN exógeno se integra en el genoma de la célula, en el que el primer vector es un minicírculo de ADN que carece de las secuencias procariotas requeridas para la replicación bacteriana, y en el que la transposasa se expresa en la célula y cataliza la escisión de la secuencia de ADN exógeno del primer vector y la integración del ácido nucleico exógeno escindido en el genoma de la célula.

15

2.- El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de ADN exógeno codifica una proteína de resistencia a antibióticos, un ARNip, una proteína indicadora, una citoquina, una quinasa, un antígeno, un receptor específico de antígeno, un receptor de citoquinas, o un polipéptido suicida, en el que el primer vector preferiblemente comprende además un promotor no procariota unido operativamente a la secuencia de ADN exógeno, y opcionalmente comprende además un potenciador, un silenciador o un aislante, también preferiblemente en el que el promotor no procariota se selecciona del grupo que consiste en el promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6.

20

25

3.- El método de la reivindicación 1, en el que el promotor en el segundo vector se selecciona del grupo que consiste en el promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6.

30 4.- El método de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en una célula T, una célula B, una célula dendrítica, un macrófago o un mastocito, o es una célula madre derivada de médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o pulpa dental, y en el que la célula es preferiblemente una célula humana.

35 5.- El método de la reivindicación 1, que comprende además linealizar el primer vector antes de la etapa de introducción.

6.- El método de la reivindicación 1, en el que el primer vector y el segundo vector se introducen en la célula mediante coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, nucleofección, compresión de células, sonoporación, transfección óptica, impalefacción, pistola de genes, magnetofección, transducción viral, o transfección a través de un dendrímero, un liposoma o un polímero catiónico.

40 7.- Un kit para integrar una secuencia de ADN exógeno en el genoma de una célula, comprendiendo dicho kit:

un recipiente;

un sistema de transposón que incluye

un primer vector que contiene:

una primera repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:1,

45 una segunda repetición invertida que tiene una secuencia de ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:2 cadena abajo de la primera repetición invertida, y

un sitio de clonación entre la primera repetición invertida y la segunda repetición invertida para introducir la secuencia de ADN exógeno, y

un segundo vector que contiene un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una transposasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;

e instrucciones asociadas con el recipiente y que indican cómo usar el sistema de transposón;

5 en el que el primer vector es un minicírculo de ADN que carece de las secuencias procariotas requeridas para la replicación bacteriana, y en el que la transposasa cataliza la escisión de la secuencia de ADN exógeno del primer vector y la integración de la secuencia de ADN exógeno escindida en el genoma de la célula.

10 8.- El kit de la reivindicación 7, en el que el promotor en el segundo vector se selecciona del grupo que consiste en el promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6.

15 9.- El kit de la reivindicación 7, en el que el primer vector comprende además un promotor no procariota cadena abajo de la primera repetición invertida y cadena arriba del sitio de clonación, en el que el promotor no procariota se selecciona del grupo que consiste en el promotor de citomegalovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor del virus de simio 40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de fosfoglicerato quinasa, el promotor de beta-actina de pollo, el promotor del factor de alargamiento 1-alfa, el promotor de H1 humano, y el promotor de U6.

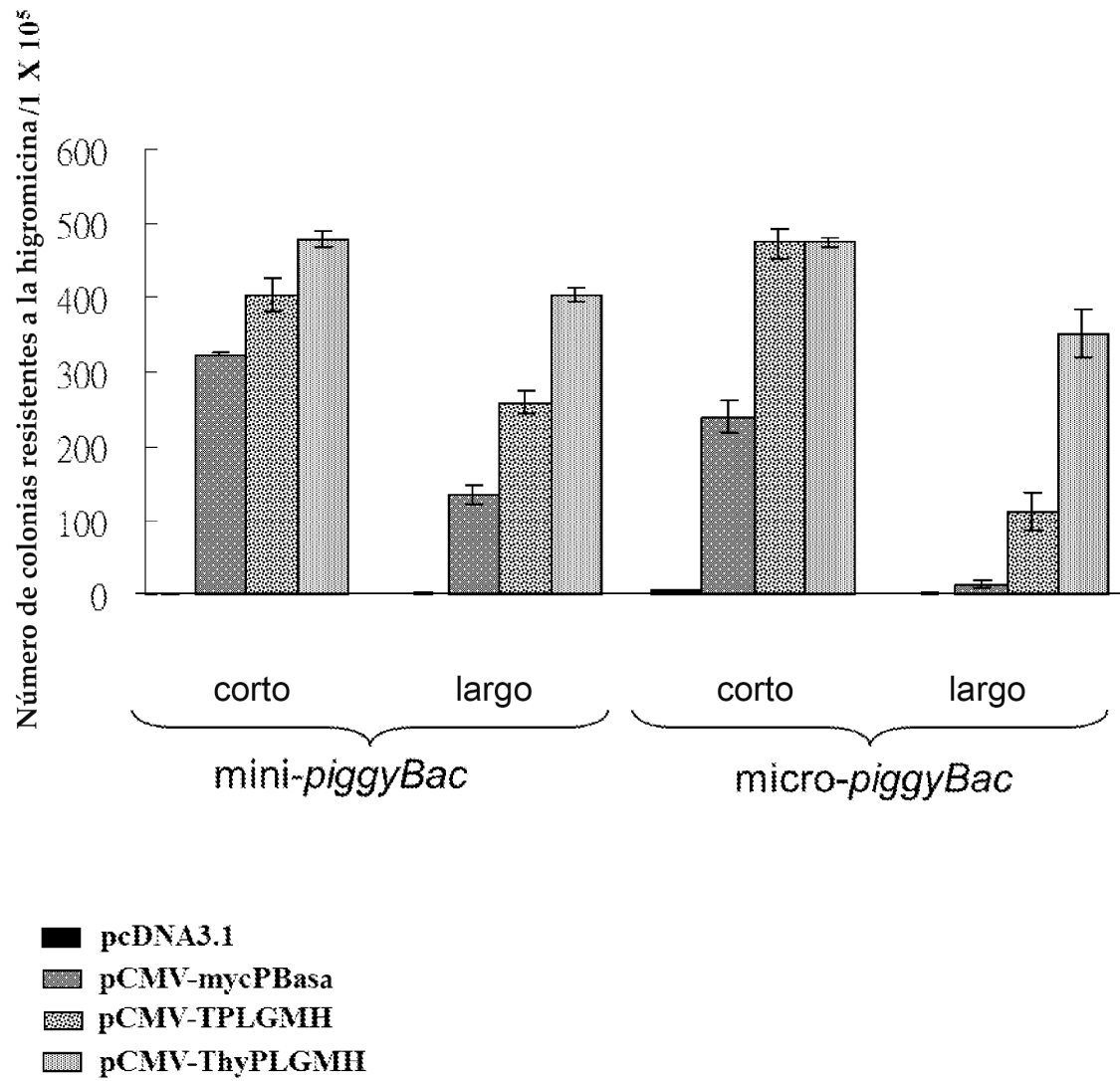


FIG. 1A

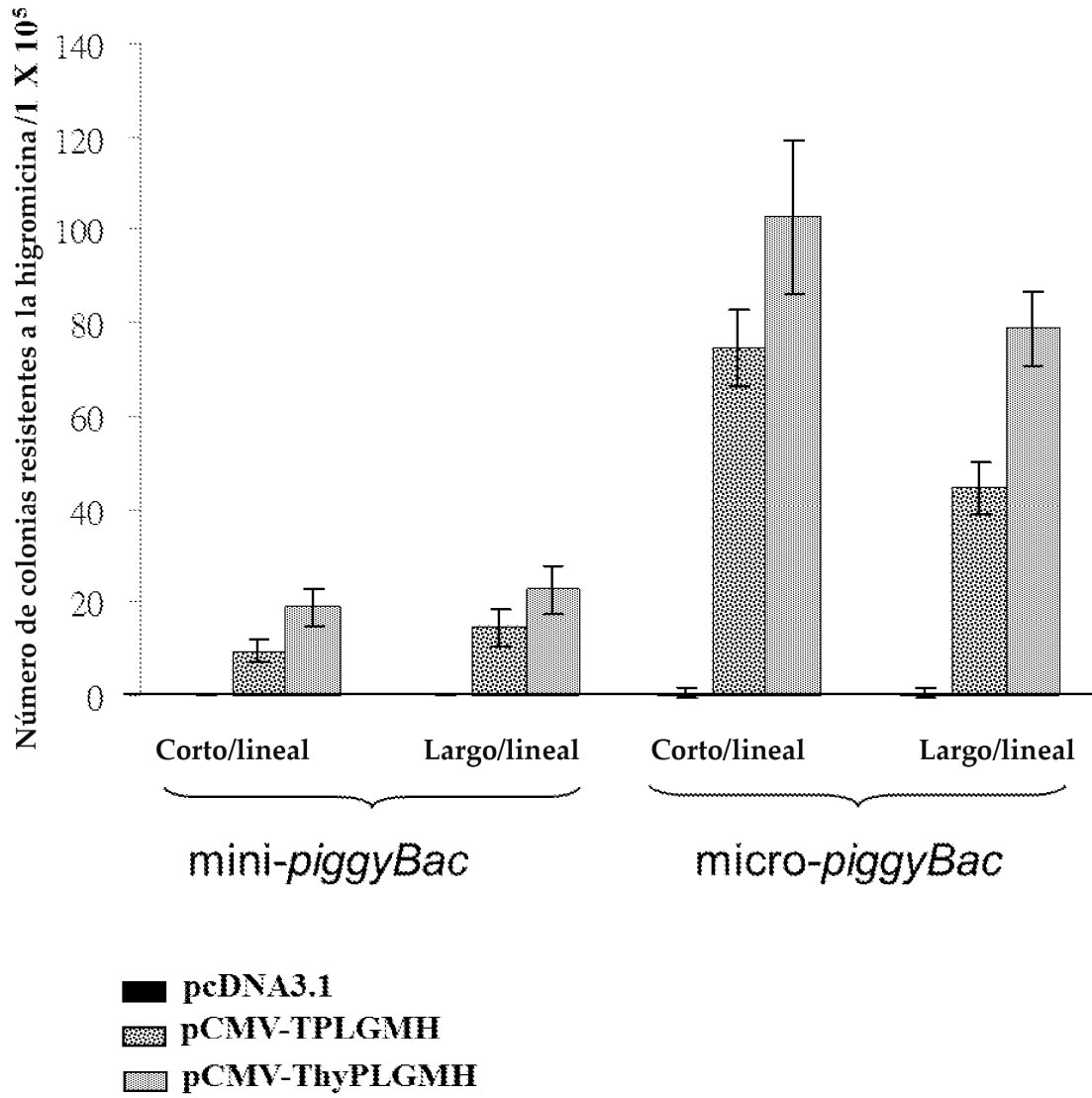


FIG. 1B

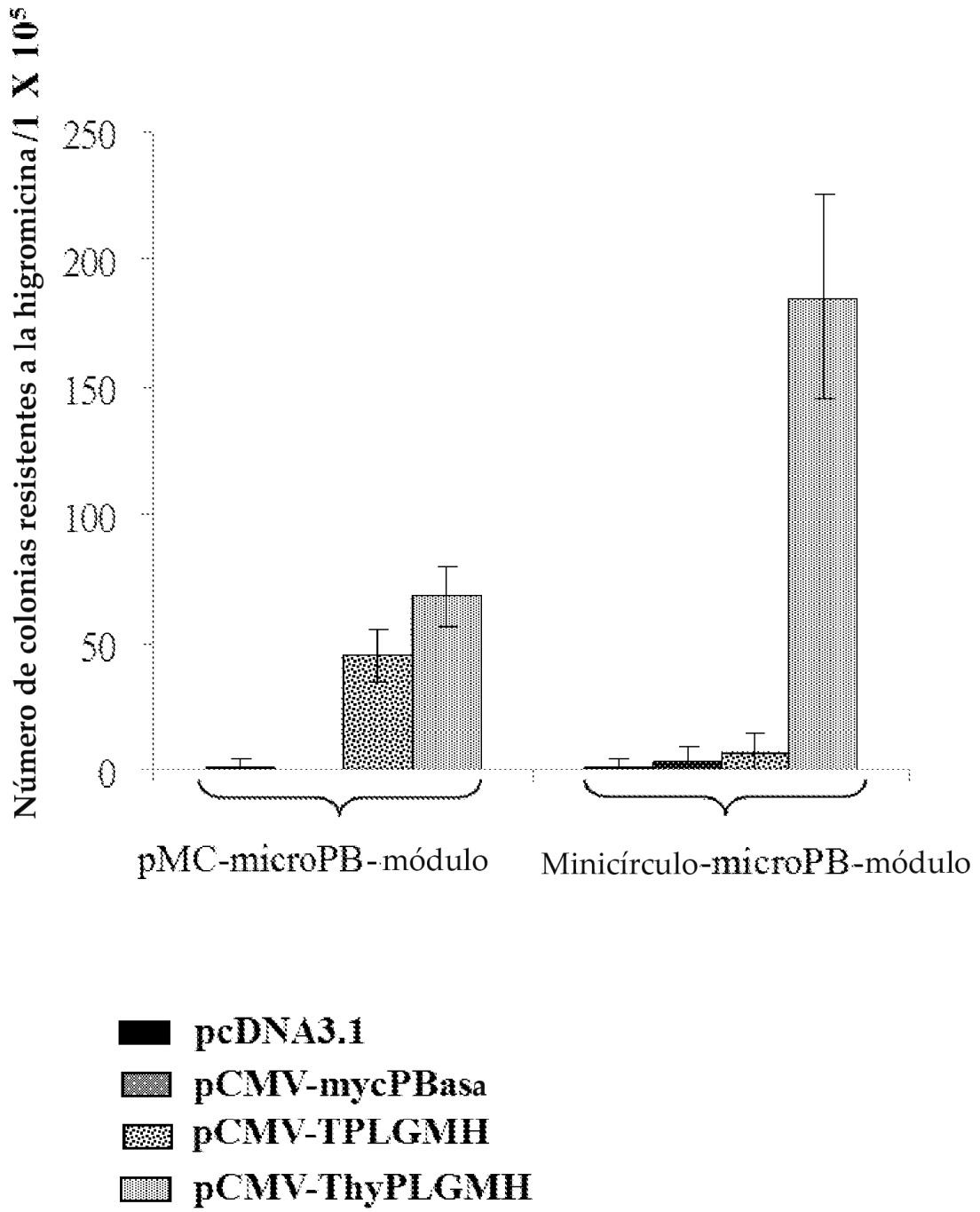


FIG. 1C

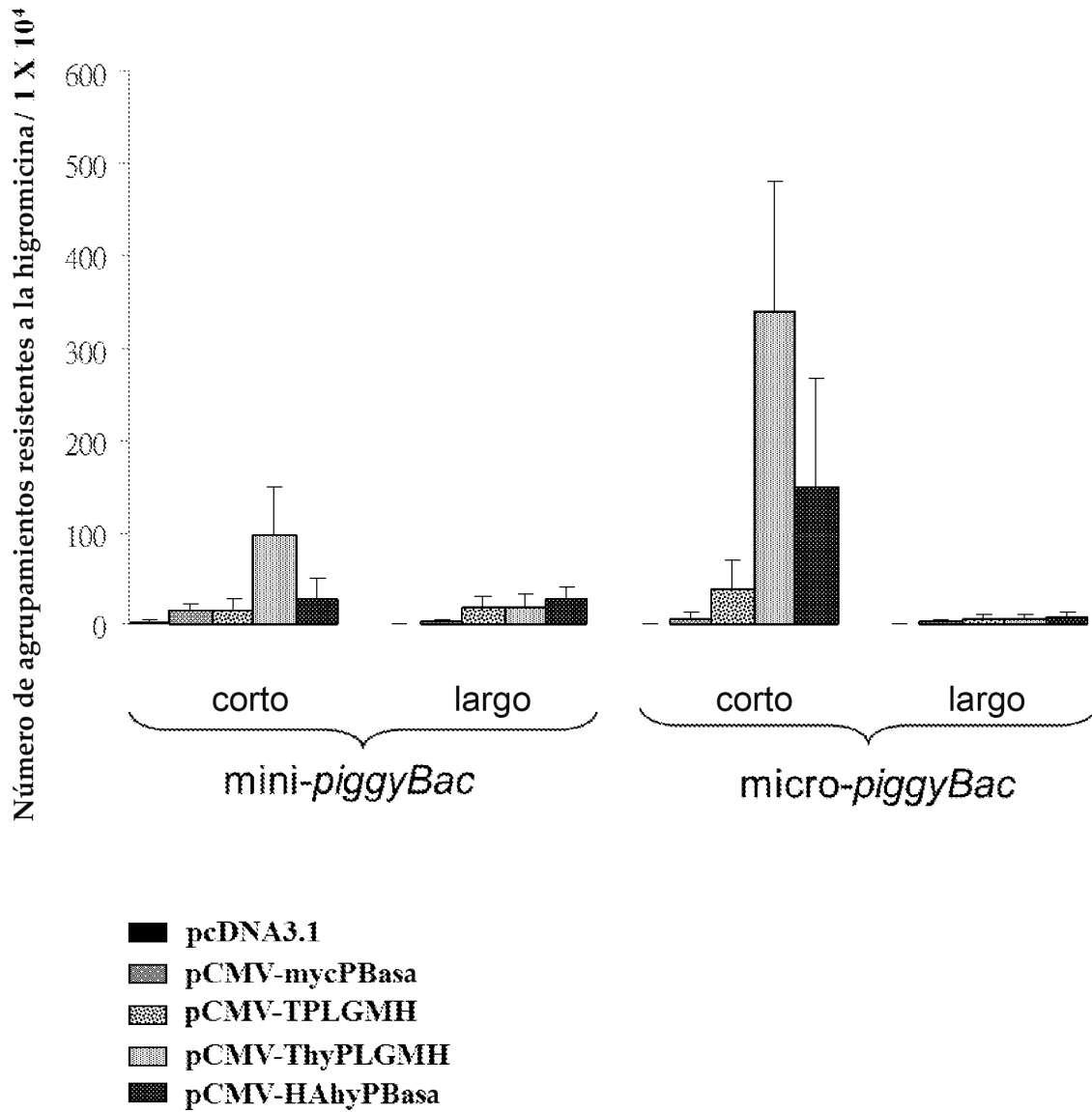


FIG. 2A

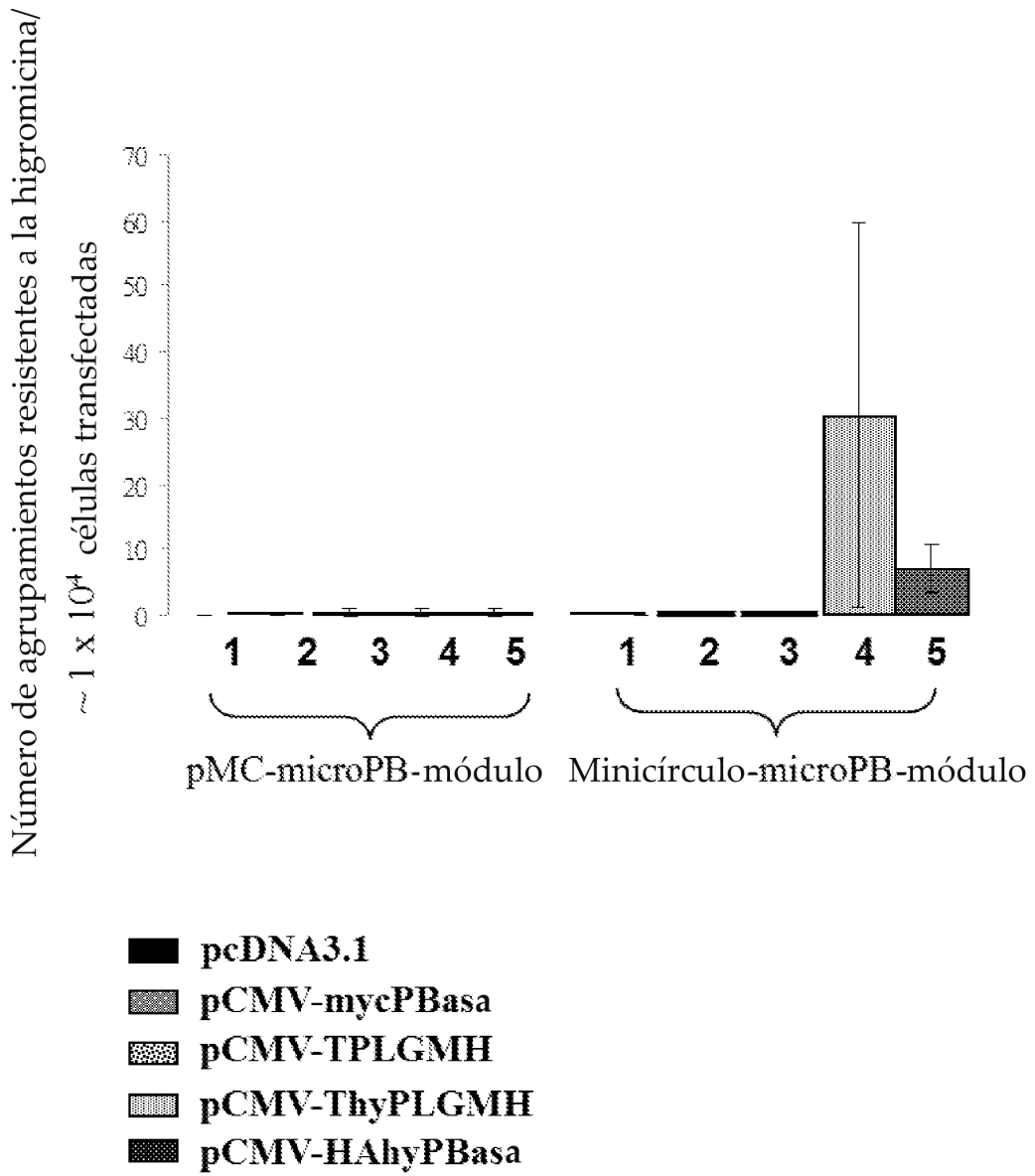


FIG. 2B

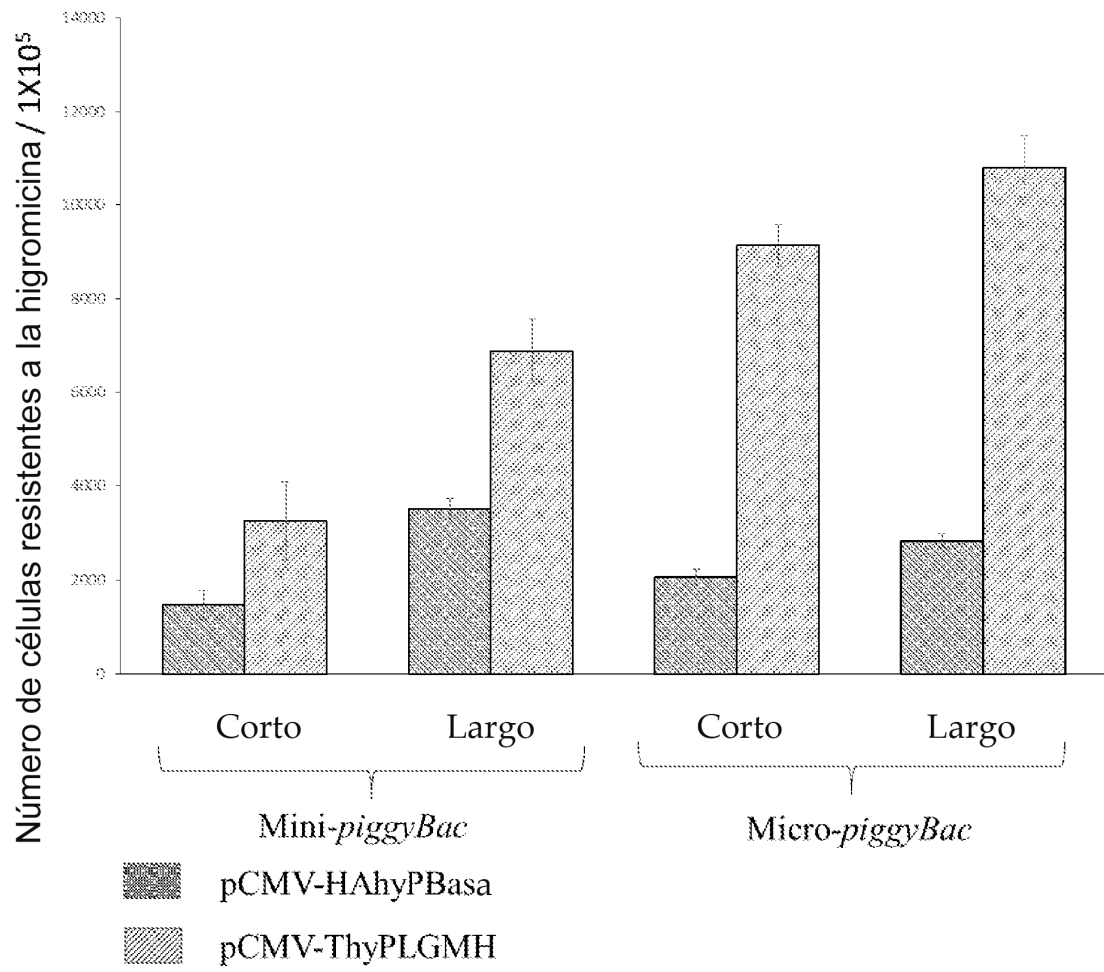


FIG. 3