



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 315**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04021854 .7**
86 Fecha de presentación : **14.09.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1634955**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Vectores genéticos condicionales regulados en *cis*.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **GSF-Forschungszentrum für Umwelt
und Gesundheit GmbH
Ingolstadter Landstrasse 1
85764 Oberschleissheim, DE**

72 Inventor/es: **Hammerschmidt, Wolfgang;
Humme, Sibille;
Pich, Dagmar y
Schepers, Aloys**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Vectores genéticos condicionales regulados en *cis*.

5 La presente invención se refiere a un sistema de vector genético condicional y a una célula huésped, que ha sido transfectada con dicho sistema de vectores. La presente invención se refiere además a una preparación combinada que comprende el sistema de vector de la invención y a un agente de interferencia. Además, se proporciona una composición farmacéutica y su uso en el tratamiento de la hemofilia, diabetes, artritis reumatoide, inmunodeficiencia genética, y la enfermedad de injerto contra huésped.

10 Los ácidos nucleicos recombinantes son la base de los vectores genéticos, los cuales se utilizan para terapia génica e inmunoterapia de varias enfermedades humanas. La mayoría de vectores genéticos comprenden componentes genéticos virales o metazoanos, los cuales proporcionan los elementos activos en *cis* necesarios tales como promotores y potenciadores para expresar uno o más genes de interés terapéutico. Además, ciertos vectores genéticos, que se diseñan en un proyecto previo de virus, también transportan las señales reguladoras esenciales implicadas en el empaquetamiento de ácidos nucleicos en componentes estructurales virales, así como elementos replicativos para la amplificación de los genomas de vectores víricos.

20 En la célula receptora, los vectores genéticos se pueden presentar sólo de forma transitoria o se pueden mantener durante un periodo largo de tiempo. En este aspecto, la información genética se pierde rápidamente mediante la degradación espontánea por nucleasas celulares o se mantiene mediante la integración de la información genética en el cromosoma de la célula receptora. Dado que en terapia génica e inmunoterapia frecuentemente se prefiere un efecto prolongado de los genes terapéuticos y sus productos, se utilizan habitualmente vectores genéticos, los cuales inducen la integración cromosómica de su información genética. En particular, todos los retrovirus y virus adenoasociados se integran como provirus durante esta parte de los ciclos de vida víricos para establecer un estado latente o persistente. De forma similar, los vectores genéticos basados en ADN también pueden integrarse de forma cromosómica.

30 La integración de ADN foráneo rompe la integridad genética del cromosoma del huésped. Como resultado, los virus integrantes, los vectores virales y los vectores genéticos basados en ADN pueden actuar como mutágenos insercionales. Las mutagénesis insercionales se observa de forma crítica, ya que los vectores retrovirales, que se han utilizado para curar una forma severa de inmunodeficiencia en humanos daba lugar a la transformación de células T oncogénicas (Hacein-Bey-Abina, *et al.*, 2003). Este problema se evita con sistemas de vectores genéticos que se mantienen como unidades extracromosómicas en la célula receptora transducida o transfectada con ADN. Todos los vectores genéticos, que se caracterizan por esta característica, derivan de plásmidos de ADN recombinantes portadores de replicones autónomos (Piechazek *et al.*, 1999; Schaarschmidt *et al.*, 2004; Sugden y Leight, 2001). Los replicones son unidades genéticas que median la replicación de ADN de los ADNs de vectores genéticos frecuentemente en sincronía con la replicación del cromosoma de la célula huésped.

40 El replicón plásmido del virus de Epstein-Barr (EBV) es el origen latente de la replicación de ADN de este virus del herpes humano. Los plásmidos que contienen este origen de replicación de ADN se replican de forma similar al genoma de su célula huésped y se mantienen de forma extracromosómica. Consecuentemente, este replicón plásmido ha sido explotado como vectores genéticos recombinantes (Sugden y Leight, 2001). El replicón plásmido de EBV, denominado *oriP*, da soporte a la replicación eficaz de ADN en células seleccionadas para retenerlo en varias copias cuando se proporciona el producto genético viral EBNA1. Los plásmidos recombinantes que contienen *oriP* se replican una vez por ciclo celular durante la fase S y se dividen de forma eficaz en células hijas, sólo se necesitan dos componentes, *oriP* en *cis* y EBNA en *trans*, la célula contribuye con el resto.

50 El replicón *oriP* consiste en dos elementos esenciales, la familia de repeticiones (FR) y una estructura denominada elemento de simetría de pareja (DS, figura 1). La iniciación de la replicación de ADN tiene lugar en el DS o próximo al mismo, en el cual se reclutan los componentes del complejo de pre-replicación celular (pre-RC), incluyendo proteínas ORC y MCM (Ritzi *et al.*, 2003; Schepers *et al.*, 2001). Es probable que EBNA1, que se une a cuatro sitios de unión de baja afinidad en DS, contribuya al reclutamiento de pre-RC, quizás conjuntamente con otras características estructurales de DS. El elemento FR es un grupo de 20 motivos de unión de afinidad elevada para EBNA1 y se dedica a actuar en la retención nuclear de *oriP*. La retención nuclear de plásmidos *oriP* se considera obligatoria para el mantenimiento a largo plazo de plásmidos y podría contribuir también a la división en cada ciclo celular. En plásmidos recombinantes de hasta aproximadamente 30 kbps de tamaño, ambos componentes, DS y FR, son esenciales para la función de *oriP*. En plásmidos recombinantes más grandes (o en el contexto del genoma de EBV), el DS puede volverse prescindible (White *et al.*, 2001) probablemente porque pre-RC se puede reclutar en áreas diferentes a DS (Schepers *et al.*, 2001). Estos resultados sugirieron que DS y FR son elementos activos en *cis* funcionalmente diferentes dedicados a la replicación de ADN y al mantenimiento del replicón, respectivamente, en células proliferantes, así como células arrestadas.

60 EBNA1 es una proteína viral que interacciona con *oriP* directamente y está caracterizada por un diseño modular. La mitad carboxi terminal comprende los residuos de aminoácidos 459 a 604 del producto génico del prototipo EBNA1 de la cepa B95.8 de EBV (Baer *et al.*, 1984), que constituye un dominio de dimerización y de unión a ADN (figura 2). La mitad amino terminal de EBNA1, en particular los residuos de aminoácidos 1 a 89 y 322 a 379, media en la asociación con cromosomas celulares (Marechal *et al.*, 1999) y es esencial para el mantenimiento del plásmido y la activación transcripcional (Yates y Camiolo, 1988). Los dominios restantes son una unidad de repetición glicina-

alanina (aminoácidos 90 a 327) supuestamente implicada en la degradación de la proteína, una señal de localización (aminoácidos 379 a 386) y un dominio de activación ácida (aminoácidos 605 a 641) (Kieff y Rickinson, 2001 para revisión).

5 Las características de asociación al cromosoma de EBNA1 desencadenó un acercamiento en el que la mitad amino terminal se sustituyó con proteínas celulares conocidas por conferir la unión a cromatina y la asociación a cromosomas mitóticos (Hung *et al.*, 2001). Entre diversos candidatos, los productos génicos quiméricos que consisten en la histona celular H1 o proteínas HMGA1a fusionadas a los residuos de aminoácidos 379 a 641 de EBNA1, sustituyeron funcionalmente el alelo de EBNA1 natural (wt) con respecto a tanto la replicación como el mantenimiento del plásmido
10 (Sears *et al.*, 2003).

Sin embargo, ninguna de las referencias o publicaciones muestra un sistema para la regulación del mantenimiento de vectores en una célula diana. Dicha regulación del mantenimiento de vectores podría comportar la ventaja de transferir la información genética a una célula diana, cuya transferencia puede ser fácilmente invertida mediante la
15 adición de un agente que está específicamente adaptado para extraer el vector de la célula diana.

Por lo tanto, un problema subyacente de la presente invención es proporcionar un sistema de vector genético condicional que se puede utilizar de forma ventajosa para transfectar células diana y que es capaz de extraerse de las mismas cuando es necesario. En otras palabras, un problema subyacente de la presente invención es proporcionar
20 sistemas de vectores genéticos que se pueden controlar mediante medios simples y no alteran genéticamente la célula o células receptoras. Otro problema subyacente de la presente invención es proporcionar un sistema de vector mejorado para transfectar células huésped, dicho vector es capaz de potenciar los números de copias del vector. Además, un problema adicional es proporcionar una unión mejorada, aunque reversible, de elementos activos en *cis* y *trans* para el objetivo anterior.

25 Estos objetos se resuelven mediante la materia de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas se establecen en las reivindicaciones dependientes.

La solución de la presente invención es la primera aproximación para establecer plásmidos de vectores genéticos extracromosómicos, cuyo mantenimiento en una célula diana específica se puede controlar en *cis* mediante, por
30 ejemplo, un compuesto de peso molecular pequeño.

Los genes procariotas *tetR* y *lacI* se han explorado para regular la transcripción eucariota de un modo condicional (Gossen y Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1989). Ambos productos génicos se han utilizados como tales
35 (Yao *et al.*, 1998) o fusionados a dominios reguladores eucariotas, que juegan papeles cruciales en la activación transcripcional (dominios VP16 de activación de la transcripción ácidos relacionados) (Baron *et al.*, 1997) o la represión (KRAB) (Deuschle *et al.*, 1995). Las funciones independientes de los módulos de DS y FR del replicón *oriP*, que se dedican a la replicación de ADN y al mantenimiento del replicón, respectivamente, es un hallazgo reciente (Aiyar *et al.*, 1998; Schepers *et al.*, 2001), que sugirió que EBNA1 juega un doble papel cuando se une a DS y FR. La estructura de EBNA1 y el elemento FR sugirieron que FR proporciona una serie de grupos de unión a los que se une específicamente EBNA1 e induce la unión de los plásmidos *oriP* a la cromatina celular mediante los denominados dominios de gancho AT (Sears *et al.*, 2003) para asegurar la retención nuclear y el mantenimiento estable del plásmido. Los dominios de gancho AT son una característica de los miembros de la familia de HMG (Harrer *et al.*, 2004), de la cual HMGA1a se une a la interfase y la cromatina mitótica durante el ciclo celular. También se reconoció que HMGA1a
45 provoca el mantenimiento estable de plásmidos wt *oriP* cuando se fusiona al dominio de unión a ADN de EBNA1 (Hung *et al.*, 2001).

El enfoque combinatorio de la presente invención se ilustra aquí con respecto a algunos ejemplos específicos, es decir, para fusionar regiones que contienen el gancho AT de EBNA1 o HMGA1a a la proteína de unión a ADN, TetR.
50 Esto reveló que (i) los plásmidos de origen híbrido se pueden mantener extracromosómicamente durante largo tiempo y (ii) se pierden tras el tratamiento con doxiciclina, la cual anula la unión del dominio de unión a ADN de TetR.

La presente invención muestra además que se pueden diseñar replicones de plásmidos de tipo *oriP* sintéticos, de maneras que los factores o dominios víricos resultan completamente prescindibles. Los cuatro sitios de unión de baja
55 afinidad en DS (figura 1) se pueden sustituir con sitios *tetO*, de manera que las proteínas de fusión que albergan el dominio de unión ADN TetR pueden reclutar también el complejo ple-replicativo al origen de la replicación de ADN. Se observó que dichos replicones de plásmidos de tipo *oriP* se pueden mantener extracromosómicamente durante semanas. Los inventores también han encontrado evidencia de que la doxiciclina conduce a una pérdida abrupta de dichos plásmidos, presumiblemente porque anula el mantenimiento del plásmido, así como la replicación de ADN.
60 Dichos replicones de plásmidos de tipo *oriP* dependen sólo de proteínas de fusión con el dominio de unión a ADN TetR y no requieren de EBNA1 para su replicación de ADN. En consecuencia, los plásmidos de vectores genéticos se pueden diseñar para transportar el replicón de tipo *oriP*, un cassette de expresión que codifica TetR:TetR:HMGA1a, y uno o más genes adicionales de interés (figura 7 para un ejemplo).

65 Se ha demostrado *in vivo* (Schoring *et al.*, 2002) la expresión génica regulada por tetraciclinas, indicando que los vectores genéticos, que se pueden regular en *cis*, es probable que también sean funcionales *in vivo*. Los mutantes del gen *terR* con un fenotipo inverso se unen a motivos *tetO* exclusivamente en presencia del fármaco (Gossen *et al.*, 1995); Urlinger *et al.*, 2000) y se espera que también sean funcionales en el presente sistema. Se supone que las

fusiones de TetR con el fenotipo inverso permitirán el establecimiento de plásmidos de tipo *oriP* sólo en presencia de tetraciclina o sus derivados, lo cual es una condición incluso más astringente para los vectores genéticos de plásmido regulados en *cis*.

Los inventores desarrollaron una primera generación de plásmidos de vectores genéticos, los cuales se pueden regular en *cis*. Estos plásmidos de vectores genéticos transportan dos genes marcadores para la selección (resistencia a puromicina o higromicina) y rastreo fenotípico (GFP o mRFP) que se pueden sustituir fácilmente por genes de interés terapéutico. Dichos plásmidos de vectores genéticos se pueden empaquetar en una partícula viral cuando se proporcionan señales de empaquetamiento necesarias (Delecluse *et al.*, 1999; Kreppel y Kochanek, 2004). Se pueden añadir genes adicionales o incluso loci genéticos de interés terapéutico, ya que la capacidad de empaquetamiento de vectores de plásmido basados en ADN o vectores virales puede ser grande, superando 100 kbps (White *et al.*, 2002).

La terapia génica somática y la inmunoterapia necesitan sistemas de vectores genéticos que se puedan controlar mediante medios simples y no alteren genéticamente la células o células receptoras. El sistema de vector genético nuevo presentado en la presente invención ofrece ambas ventajas y debería contribuir a la viabilidad de enfoques terapéuticos innovadores. Además, el presente sistema proporciona la ventaja de dar lugar a un mayor número de copias del plásmido tal y como se ilustra en la figura 6.

La presente invención está dirigida en particular a los siguientes aspectos y realizaciones:

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un sistema de vector genético condicional que comprende los siguientes elementos:

- a) un vector portador de un elemento activo en *cis* y unas o más secuencias codificantes y/o no codificantes, y
- b) un factor activo en *trans* que tiene un dominio de unión a ADN capaz de unirse a una región del elemento activo en *cis* y un dominio capaz de mantener la proteína en el núcleo de una célula diana,

caracterizado porque

en el que se selecciona la región del elemento activo en *cis* y el dominio de unión a ADN del factor activo en *trans* capaz de unirse a la región del elemento activo en *cis* que el mantenimiento nuclear de dicho vector portador del elemento activo en *cis* en una célula diana puede estar regulado por la adición de un agente capaz de interferir en la unión de dicho factor activo en *trans* a dicho elemento activo en *cis*.

El término “mantenimiento” tal y como se describe en la presente invención se refiere a un efecto importante de la presente invención, es decir, el efecto de mantener un vector en una célula diana deseada tanto tiempo como se desee, por ejemplo, en un intento por tratar un animal o un humano mediante terapia génica. “Mantenimiento” tal y como se utiliza en la presente invención tiene un significado muy específico que se debería distinguir claramente de los términos relacionados utilizados normalmente en el sector de la ciencia; por “mantenimiento” se entiende que un elemento, en el contexto específico de la presente invención un factor activo en *trans*, está unido firmemente al núcleo de una célula diana, en particular al esqueleto de cromatina del núcleo. “Unido firmemente” tal y como se utiliza en la presente invención, significa que el elemento respectivo se mantiene en la célula durante todas las etapas del ciclo celular (etapas G1, S, G2 del ciclo celular), en particular incluyendo la mitosis.

El término “mantenimiento”, por lo tanto, también se puede definir como la capacidad de unión a cromatina mitótica. Debe indicarse que el término anterior debe diferenciarse estrictamente de otras características que se muestran, por ejemplo, mediante secuencias de localización nuclear (NLS). Muchas proteínas, por ejemplo, factores de transcripción y proteínas nucleares estructurales, deben moverse desde el citosol hasta el interior del núcleo. Se dirigen al núcleo mediante su secuencia de localización nuclear. Estas proteínas se transportan de forma activa a través de poros en el envoltorio nuclear en el interior. Sin embargo, estas NLS sólo se pueden considerar como una señal de transporte y no proporcionan el “mantenimiento” tal y como se explica en la presente invención, es decir, una unión firme (y reversible) de las proteínas a componentes del núcleo de la célula diana. Por lo tanto, el efecto del sistema de vector de la presente invención también se puede denominar “mantenimiento y/o retención nuclear del plásmido”.

Los términos “elemento activo en *cis*” y “factor activo en *trans*” tal y como se utilizan en la presente invención, tienen el significado tal y como se utiliza habitualmente en el sector de la ciencia. Los elementos activos en *cis* se definen normalmente como secuencias de ADN en la proximidad de la parte estructural de un gen o, en cualquier caso, como una unidad genética que son funcionalmente necesarias. Los factores activos en *trans* son factores, normalmente considerados como proteínas, que se unen a las secuencias activos en *cis* para controlar la expresión génica, por ejemplo.

Alguien experto en la técnica puede determinar fácilmente qué dominios de proteína son capaces de mantener o no la proteína en el núcleo de una célula diana. Esto se puede determinar, por ejemplo, mediante el aislamiento y la identificación de proteínas que se unen firmemente a la cromatina en la interfase o la cromatina mitótica de una célula durante el ciclo celular.

Un ejemplo para un factor activo en *trans* en el alcance de las definiciones establecidas en la presente invención es EBNA1 wt mencionado anteriormente y descrito a continuación, el cual también se ilustra en la figura 2A. En la misma, se muestra en producto génico de EBNA1 natural de la cepa B95.8 del prototipo EBV con dominios funcionales designados y sus residuos de aminoácidos. De este modo, EBNA1 tiene un dominio de unión a ADN capaz de unirse a una región del elemento activo en *cis*, que, en este caso, es la secuencia FR de *oriP*. Por consiguiente, *oriP* es el correspondiente elemento activo en *cis* aquí. Además, EBNA1 muestra un dominio capaz de mantener la proteína en el núcleo de una célula diana denominada “asociación a cromatina” en la figura 2A.

Sin embargo, se indica explícitamente que el sistema EBNA1-*oriP* derivado de EBV no muestra el principio de la presente invención, ya que el mantenimiento de un vector portador del elemento activo en *cis*, *oriP*, en una célula diana puede no estar regulado por la adición de un agente, en particular un compuesto de peso molecular pequeño, capaz de interferir con la unión de EBNA1 a *oriP*. De este modo, el sistema EBNA1-*oriP* no funciona en el sentido de la presente invención, aunque puede modificarse tal y como se explica a continuación con el fin de resolver los problemas planteados en la presente invención.

El término “compuestos de peso molecular pequeño” tal y como se utiliza en la presente invención se entiende como un grupo de compuestos que tienen un peso molecular entre 50 y 2000, preferiblemente 100-1000.

Según una realización, el elemento activo en *cis* utilizado en la presente invención deriva de un elemento activo en *cis* natural, en el que la región dispuesta para la unión de dicho elemento activo en *cis* al correspondiente factor activo en *trans* natural está sustituida por una secuencia de ADN heteróloga, y que el factor activo en *trans* deriva de un factor activo en *trans* natural, en el que el dominio de unión a ADN capaz de unirse a una región del elemento activo en *cis* está sustituido por una secuencia de aminoácidos heteróloga.

Para esta realización, la modificación indicada anteriormente del sistema *oriP*-EBNA1 puede servir como ejemplo. Dado que la unión entre *oriP* y EBNA1 puede no estar interferida o interrumpida por un agente de interferencia, ambas secuencias, es decir, el dominio de unión a ADN capaz de unirse a una región de la región FR de *oriP* se sustituye por una secuencia heteróloga, por ejemplo, por TetR, y, por consiguiente, la región FR de *oriP* se sustituye por un fragmento *tetO*. Después de esta modificación, un sistema de vector tendrá como resultado todos los elementos tal y como se indica en el primer aspecto de la presente invención, es decir, puede regularse *in vivo* e *in vitro* por un agente de interferencia, en este caso específico por doxiciclina.

De este modo, el término secuencia “heteróloga” no está limitado específicamente y comprende la sustitución de las secuencias naturales por otras secuencias, tanto si derivan de una fuente relacionada o no relacionada (en el caso de EBV, puede, por ejemplo, derivarse de otro virus, o, tal y como se ha explicado anteriormente, de una fuente procariota).

Según una realización preferida, el elemento activo en *cis* es natural y se selecciona del origen plásmido de replicación de ADN de virus de Epstein-Barr, denominado *oriP*, o de motivos de ADN a los que los factores que actúen en *trans* se unen específicamente de sitio, tal como un operador *lacO*, sitios de unión a GAL4, OR1/2, operador *tetO* u operador *lexA*, que se pueden encontrar en *E. Coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, fago lambda, transposón Tn10 y *E. Coli*, respectivamente.

Tal y como se ha explicado anteriormente, los elementos activos en *cis* naturales deben modificarse con el fin de adaptarlos a la regulación de un agente de interferencia.

Según una realización preferida, el dominio de unión a ADN del factor activo en *trans* se selecciona preferiblemente de EBNA1, represor LacI, proteína GAL4, proteína Cro, la proteína LexA o el represor Tet, que se pueden encontrar en el virus de Epstein-Barr, *E. Coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, fago lambda, transposón Tn10, *E. Coli* o humanos, respectivamente.

Además, el dominio capaz de mantener el factor activo en *trans* en el núcleo de una célula diana se selecciona preferiblemente de EBNA1, Histona H1 o HMGA1a.

Según una realización preferida, la región de unión del elemento activo en *cis* contiene uno o más sitios *tetO* (operador tet), *lacO* (operador lac) u otros sitios operadores derivados de elementos activos en *cis* no presentes en la célula diana del vector genético. Esta restricción debe considerarse con el fin de evitar una unión específica de sitio inapropiada del factor activo en *trans* de la presente invención en la célula diana (conduciendo a una competición de unión con el vector portador del elemento activo en *cis* de la presente invención).

En particular, *tetO* resultó ser preferido en la presente invención, dado que su unión a TetR puede romperse en presencia de doxiciclina como agente de interferencia.

De este modo, el sistema de vector de la presente invención comprende preferiblemente una región de unión del elemento activo en *cis* que consiste en al menos de 5 x sitios *tetO* a 200 x sitios *tetO*, preferiblemente de 10 x sitios *tetO* a 100 x sitios *tetO*, más preferiblemente de 20 a 40 sitios x *tetO* o al menos de 5 x sitios *lacO* a 200 x sitios *lacO*, preferiblemente de 10 x sitios *lacO* a 100 x sitios *lacO*, preferiblemente de 20 a 40 sitios x *lacO*.

ES 2 297 315 T3

El dominio de unión a ADN del factor activo en *trans* es preferiblemente TetR (Represor Tet) o LacI (Represor Lac) si se utiliza en conexión con las regiones de unión indicadas anteriormente de los elementos activos en *cis*.

De este modo, según una realización particularmente preferida de la presente invención, el factor activo en *trans* deriva de EBNA1, donde las secuencias carboxi terminal se sustituyeron por TetR o LacI. Concretamente, pero únicamente más a modo de ejemplo que de restricción, las secuencias de carboxi terminal se pueden definir como los aminoácidos 379-641, más preferiblemente 459-604, tal y como se representa en la figura 2A. De este modo, el factor activo en *trans* toma preferiblemente la forma de EBNA1: TetR (véase la figura 2B).

Incluso más preferiblemente, en el sistema de vector de la presente invención, el factor activo en *trans* es HMGA1 o histona H1 fusionados a TetR o LacI, por ejemplo TetR:TetR:HMGA1a.

Preferiblemente, el vector portador del elemento activo en *cis* y una o más secuencias codificantes y/o no codificantes, y utilizado en el presente sistema de vector es un plásmido.

La secuencia codificante transportada en el vector se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en antígenos, proteínas marcadoras seleccionables y fenotípicas y genes que complementan un defecto genético somático en la célula o células diana del vector genético. Los defectos genéticos somáticos en estos genes (y enfermedades) y los genes que complementan a los mismos se pueden seleccionar entre los siguientes: hemoglobina alfa, beta, gamma, delta (talasemia); receptor de citoquina de cadena gamma común (SCID); adenosin desaminasa (deficiencia inmune de ADA); tirosina quinasa de Bruton (deficiencia inmune de células B); factor de coagulación VIII (hemofilia A); factor de coagulación IX (hemofilia B) y trastornos del almacenamiento lisosomal (Morbus Gaucher, mucopolisacaridosis, etc.).

El vector puede transportar secuencias codificantes de aproximadamente 120 kb.

El vector puede contener adicionalmente más secuencias no codificantes, por ejemplo, secuencias de promotor, con el fin de controlar la transcripción de una o más secuencias codificantes contenidas en el mismo.

Todos los elementos esenciales del sistema de vector de la presente invención están presentes preferiblemente en un único vector. Un vector de ejemplo y preferido de este tipo se representa en la figura 7. Transporta el replicón activo en *cis* y el factor activo en *trans* TetR:TetR:HMGA1a, que se indican en el centro del mapa. Dos genes marcadores adicionales que codifican para GFP desestabilizada e higromicina B fosfotransferasa son funcionales en células de metazoanos, mientras que el gen de β -lactamasa confiere resistencia a ampicilina en *E. Coli*.

Esa es la razón por la cual la presente invención se denomina “sistema de vector”, ya que puede proporcionar los dos elementos esenciales, es decir, el elemento activo en *cis* y el elemento activo en *trans*, de modo separados o combinados, en sólo un único vector.

El agente de interferencia tal y como se utiliza en la presente invención se selecciona con el fin de adaptarse al sistema *cis-trans* exactamente utilizado, pero preferiblemente, se puede seleccionar de doxiciclina, tetraciclina, isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG), iones de metales complejantes, preferiblemente Zn^{2+} , u hormonas.

Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que se ha transfectado con un vector tal y como se ha definido en la presente invención anteriormente. El factor activo en *trans* también está codificado por este vector. La célula huésped es preferiblemente una célula madre humana o animal, preferiblemente una célula madre hematopoyética, una célula T o una célula B.

Según un tercer aspecto, la presente invención proporciona una preparación combinada que comprende:

a) El sistema de vector tal y como se ha definido anteriormente y b) el agente de interferencia tal y como se define en la presente invención.

En esta preparación combinada, los componentes a) y b) están destinados a la administración posterior (se explicará con detalle a continuación).

Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene el sistema de vector, una célula huésped o una preparación combinada tal y como se describe en la presente invención, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

De este modo, los ingredientes de la presente invención se utilizan preferentemente en forma de una composición farmacéutica donde se mezclan con portadores o excipientes adecuados en dosis para tratar o aliviar la enfermedad. Dicha composición puede contener también (además del ingrediente y el portador) diluyentes, rellenos, sales, tampones, estabilizadores, solubilizadores y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término “aceptable farmacéuticamente” significa un material no tóxico que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del portador dependerán de la ruta de administración. La composición farmacéutica puede contener además otros agentes que aumentan la actividad o el uso en el tratamiento. Dichos factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico o para minimizar los efectos secundarios.

Las técnicas de formulación y administración de los componentes de la presente solicitud pueden encontrarse en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA última edición. Siempre que se utilicen las composiciones con propósitos médicos, contendrán una dosis terapéuticamente eficaz del respectivo ingrediente. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a aquella cantidad del compuesto/ingrediente suficiente para dar lugar a una mejora de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas condiciones. Se prefiere la administración intravenosa al paciente de la composición farmacéutica de la presente invención.

Según un aspecto adicional, la presente invenciones refiere al uso del sistema de vector o una composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia, la diabetes, la artritis reumatoide, la inmunodeficiencia genética, y la enfermedad de injerto contra huésped.

A continuación, se expone un procedimiento de tratamiento de un paciente que incluye la etapa de administración de una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica tal y como se describe en la presente invención para un paciente con necesidad de dicho tratamiento. Dicho procedimiento de tratamiento sigue el siguiente protocolo:

Un vector, que preferiblemente comprende todos los elementos esenciales y adicionalmente los no esenciales de la presente invención colocados en un único vector, se transfiere a una célula huésped, preferiblemente una célula madre hematopoyética. Las células huésped y los vectores contenidos en la misma se propagan *in vitro* y posteriormente, se administran a un paciente que padecía de una enfermedad concreta. En el paciente, el elemento activo en *trans* expresado, a través de su región de unión a ADN, se une a la región de unión del elemento activo en *cis* en el vector, uniéndose de este modo el vector al núcleo de la célula diana en un paciente a través de su dominio de mantenimiento. De esta manera, la información genética ni se pierde rápidamente por degradación espontánea mediante nucleasas celulares ni se mantiene por la integración de la información genética en el cromosoma de la célula receptora. En cambio, se mantiene de forma reversible en el núcleo de la célula diana.

En el transcurso del tratamiento, se expresa la secuencia codificante, proporcionando por tanto el producto necesitado terapéuticamente para el paciente. Si se completa el tratamiento o si se interrumpe, se administra el agente de interferencia al paciente, que conduce a una interrupción de la unión del elemento activo en *trans* al elemento activo en *cis* y, de este modo, libera el vector, el cual, a continuación, es extraído de la célula diana mediante la degradación de nucleasas celulares.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado tal y como se entiende habitualmente por un experto en la materia al que pertenece esta invención. Además, los materiales, procedimientos, y ejemplos son sólo ilustrativos y no tienen la intención de ser restrictivos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los dibujos que se acompañan, en los cuales se muestra lo siguiente:

Figura 1: Visión general esquemática del replicón *oriP* natural (wt) y del replicón híbrido 20*xtetO*. Se muestra el replicón viral *oriP* con los dos elementos “familia de repeticiones” y “simetría de pareja”, que llevan respectivamente 20 y 4 sitios de unión a EBNA1. Cada sitio de unión a EBNA1 tiene un tamaño de 30 pares de bases; el llamado elemento rep* es auxiliar y puede contribuir a la replicación de ADN de los plásmidos *oriP* en determinadas condiciones. La modificación del replicón híbrido 20*xtetO* constituye un grupo de veinte sitios de unión *tetO* (5'-TCCCTATCAGTGATAGAGA-3') a los cuales la proteína TetR se une con una afinidad elevada.

Figura 2: Diseño de factores activos *trans* y líneas celulares. (A) Se muestra el producto génico de EBNA1 natural de la cepa B95.8 del prototipo EBV con dominios funcionales designados y sus residuos de aminoácidos. (B) El producto génico de fusión EBNA1:TetR con el dominio amino-terminal de EBNA1 unido mediante un dominio de unión artificial [(SG₄)₅] a una región codificante completa del gen *tetR* seguido del dominio F, un dominio de activación transcripcional derivado de VP16 (Kuerger *et al.*, 2003). En contraste con la EBNA1 natural en (A), se eliminan aproximadamente la mitad de las repeticiones Gly-Ala tal y como se indica (Δ) sin consecuencias funcionales. (C) El producto génico de fusión dimérico TetR:TetR:HMGA1a con dos genes *tetR* unidos mediante un dominio de unión artificial como en (B). (D) Análisis de transferencia Western de la línea de células HEK293 parentales (banda izquierda) y sus derivados que expresan EBNA1 (banda central) y EBNA1 más EBNA1:TetR (banda derecha). Las proteínas se detectaron con dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el carboxi Terminal de EBNA1 y TetR. (E) Análisis de transferencia Western de la línea de células HEK293 parentales (banda izquierda) y sus derivados que expresan TetR:TetR:HMGA1a (banda derecha). La proteína se detectó con un anticuerpo monoclonal dirigido contra TetR.

Figura 3: El dominio de unión a ADN TetR fusionado a EBNA1 confiere mantenimiento al plásmido. Los plásmidos de prueba 2832 (*oriP* wt) y 2835 (20*xtetO*) se transfectaron por separado en la línea de células HEK que expresan tanto EBNA1 como EBNA1:TetR. Las células se cultivaron en presencia de concentraciones selectivas de puromicina (125 ng/ml) con o sin 2,0 μg/ml de doxiciplina (DOX) durante unos días hasta que las células hubieron alcanzado la confluencia. Se aisló el ADN de peso molecular bajo según el procedimiento de Hirt, se dividió con una enzima de restricción para linealizar los plásmidos de prueba y *DPnI* para digerir los plásmidos no replicados, los cuales retienen el patrón de metilación *dam* que los plásmidos habían adquirido durante la propagación en *E. coli*. El ADN plásmido resistente a *DPnI* de longitud completa se detectó mediante análisis de transferencia Southern con una sonda radioactiva, la cual se hibrida sólo a la estructura del plásmido procariota de los plásmidos de prueba 2832 y 2835. Mientras

la doxyciclina apenas tuvo efecto en el plásmido 2832 *oriP wt*, no se detectó señal cuando las células se transfectaron con el plásmido de prueba 2835 20*xtetO* híbrido y se mantuvieron en un medio que contenía doxyciclina y el fármaco selectivo puromicina. La parte izquierda muestra el plásmido 2832 *oriP wt* en la línea de células HEK293 que expresa sólo EBNA1. La señal más fuerte indica un número de copias más elevado de este plásmido cuando EBNA1 se expresa de manera exclusiva.

Figura 4: La doxyciclina interfiere con el periodo de mantenimiento del plásmido a corto plazo. En este experimento se utilizaron tres líneas celulares HEK293 diferentes que expresan proteína no viral (control, cuadros de la fila superior), EBNA1 (cuadros de la fila del centro) y ambos EBNA1 más EBNA1:TetR (cuadros de la fila inferior). Se examinaron dos plásmidos de prueba diferentes que codifican proteína de fluorescencia roja (mRFP). El plásmido 3154 transporta *oriP wt* mientras que 3155 es un plásmido de prueba con el origen híbrido y 20 sitios *tetO* (Tabla 1). Las tres líneas celulares se transfectaron con los plásmidos de prueba y se seleccionaron sólo con puromicina durante dos a cuatro días hasta que la mayoría de las células adherentes parecieran de color rojo brillante bajo luz UV en el microscopio (día 0). La presión selectiva se aligeró y las células se mantuvieron en un medio de cultivo celular normal con o sin doxyciclina (2,0 µg/ml) durante un periodo de 12 días. Ninguna de las células o sólo unas pocas parecieron expresar mRFP en células HEK293 parentales transfectadas con los dos plásmidos de prueba en el punto de tiempo (fila superior y datos no mostrados), indicando que ambos plásmidos de prueba se perdieron rápidamente en ausencia de EBNA1 y EBNA1:TetR. En células HEK293 que expresaban EBNA1 y transfectadas con el plásmido de prueba 3154 *oriP wt*, una considerable fracción de células aún expresaron mRFP en presencia o ausencia de doxyciclina (fila del centro, +/- DOX) después de 12 días. Las células HEK293 que expresaban ambos factores trans y transfectadas con el replicón plásmido 3155 de prueba híbrido fueron positivas de mRFP sólo cuando las células se habían cultivado en ausencia de doxyciclina (fila inferior).

Figura 5: Los plásmidos de origen híbrido se pierden abruptamente en presencia de doxyciclina. El plásmido *oriP wt* (3230) y los dos plásmidos de origen híbrido 20*xtetO* (3231) y 40*xtetO* (3293) se transfectaron en células HEK293 que expresaban tanto EBNA1 como TetR:TetR:HMGA1a (figura 2E) y se seleccionaron con higromicina (80 µg/ml) durante 19 días. En ese punto de tiempo (día 0) se eliminó la selección y las células se cultivaron con o sin doxyciclina (DOX, 2,5 µg/ml) durante 12 días. El ADN de peso molecular bajo se preparó según el procedimiento de Hirt en los días 8 y 12. Los ADN extraídos con Hirt también se prepararon a partir de las mismas células, las cuales se mantuvieron bajo una selección continua con higromicina. Los ADN se dividieron con *DpnI* para digerir trazas de ADN plásmido no replicados y una enzima de restricción (*PmlI*) que divide sólo el ADN celular y se analizó después de la electroforesis en un gel de agarosa mediante hibridación de transferencia Southern con una sonda radioactiva, la cual se hibrida a la estructura procariota de los plásmidos de vectores genéticos. La línea de control indica el patrón de migración de 500 pg de ADN del plásmido de control 3230 derivado de *E. coli* con las posiciones de las formas de ADN plásmido monomérico superenrollado, cerrado covalentemente, circular (ccc), monomérico de círculos abiertos (oc) y multímeros (mult.). Las formas de ADN ccc y oc indican la presencia de plásmidos extracromosómicos durante todo el experimento. Tras la adición de doxyciclina, los plásmidos de origen híbrido 20*xtetO* y 40*xtetO* se perdieron abruptamente en los días 8 y 12, pero se mantuvieron a números de copias más elevadas que *oriP wt* con o sin selección con higromicina en ausencia de doxyciclina.

Figura 6: La doxyciclina subregula los niveles de expresión de GFP codificada por el vector y provoca la pérdida de números de copia de plásmido en experimentos de rescate de plásmidos. El plásmido *oriP wt* (3230) y los dos plásmidos de origen híbrido 20*xtetO* (3231) y 40*xtetO* (3293) se transfectaron en células HEK293 que expresaban tanto EBNA1 como TetR:TetR:HMGA1a y se trataron tal y como se describe en la figura 5. En los días 4, 8 y 12, después de la omisión de higromicina del medio de cultivo celular, las células se analizaron mediante FACS para la expresión de GFP codificada por los tres plásmidos. En los días 8 y 12, el ADN extraído con Hirt se preparó y se dividió con *DpnI* tal y como se describió en la figura 5. 600 ng de ADN de cada muestra se transformaron mediante electroporación en células de *E. coli* DH10B competentes. Después de la expresión fenotípica, las fracciones diferentes de los cultivos de *E. coli* se emplacaron en placas LB que contenían ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 30°C durante 20 horas. Se contaron las colonias y se calculó el número total de células resistentes a ampicilina en estos experimentos de rescate de plásmidos. Se proporciona el número de colonias para cada uno de los tres plásmidos de prueba con o sin doxyciclina (DOX) tal y como se ha indicado.

Figura 7: Mapa genético del plásmido 3333. Se muestra un plásmido 3333 de vector genético, que se replica y se mantiene extracromosómicamente en células HEK293 parentales. El replicón activo en *cis* y el factor activo en *trans* TetR:TetR:HMGA1a se indican en el centro del mapa. Dos genes marcadores adicionales que codifican para la GFP desestabilizada e higromimicina B fosfotransferasa son funcionales en células de metazoanos, mientras que el gen de β-lactamasa confiere resistencia a ampicilina en *E. Coli*.

Ejemplos

El dominio de unión a ADN TetR de procariota fusionado a EBNA1 confiere el mantenimiento del plásmido.

Los inventores quisieron evaluar dos hipótesis de trabajo: (i) ¿puede un dominio heterólogo pero funcionalmente similar sustituir el dominio de unión a ADN de EBNA1? (ii) ¿es posible identificar dicho dominio de unión a ADN cuya unión es condicional para montar un interruptor que controla el mantenimiento de plásmidos *oriP*? Con estos objetivos, los inventores construyeron en primer lugar una proteína de unión a ADN sintética para mimetizar la función de EBNA1 en términos de mantenimiento del plásmido y, por consiguiente, sustituyeron el elemento FR de *oriP*.

Tal y como se muestra en las figuras 2A y 2B, el dominio de unión a ADN de EBNA1 se eliminó y se sustituyó con el marco de lectura abierto completo del dominio de unión a ADN procariota TetR. Al igual que EBNA1, el producto génico *tetR* forma homodímeros y se une a su motivo de ADN cognato con una afinidad muy elevada. Con el fin de sustituir el dominio de transactivación ácida de EBNA1 en su extremo carboxi terminal distal, los inventores utilizaron un dominio funcionalmente equivalente en la misma localización (dominio F en la figura 2B) (Krueger *et al.*, 2003). Esta proteína quimérica se denominó EBNA1:TetR. El gen *EBNA1:TetR* expresado a partir de un promotor heterólogo se integró de manera estable con procedimientos convencionales en la línea de células humanas HEK293 que también expresa EBNA1 natural. Tal y como se muestra en la figura 2D, esta línea celular expresa ambas proteínas. Con el fin de permitir la unión de EBNA1:TetR a *oriP*, los inventores sustituyeron el conjunto completo de FR implicados en el mantenimiento del plásmido con un número idéntico de repeticiones directas a las que TetR se une con una gran afinidad. Este plásmido de prueba denominado 2835 (Tabla 1) también transporta un gen marcador seleccionable para resistencia a puomicina y GFP como marcador fenotípico. El plásmido 2832 parental es idéntico a 2835 a excepción de que transporta *oriP* natural.

Los plásmidos de prueba 2832 (*oriP wt*) y 2835 (20*xtetO*) se transfectaron por separado en la línea de células HEK que expresan tanto EBNA1 como EBNA1:TetR. Las células se cultivaron en presencia de concentraciones selectivas de puomicina (125 ng/ml) con o sin 2,0 µg/ml de doxiciclina (DOX) durante unos días hasta que las células hubieron alcanzado la confluencia. Se aisló el ADN de peso molecular bajo según el procedimiento de Hirt, se dividió con una enzima de restricción para linealizar los plásmidos de prueba y *DPnI* para digerir los plásmidos no replicados, los cuales retienen el patrón de metilación *dam* que los plásmidos habían adquirido durante la propagación en *E. coli*. Tal y como se muestra en la figura 1, el ADN plásmido resistente a *DPnI* de longitud completa se detectó mediante análisis de transferencia Southern con una sonda radioactiva, la cual se hibrida sólo a la estructura del plásmido procariota de los plásmidos de prueba 2832 y 2835. Mientras la doxiciclina apenas tuvo efecto en el plásmido 2832 *oriP wt*, no se detectó señal cuando las células se transfectaron con el plásmido de prueba 2835 20*xtetO* híbrido y se mantuvieron en un medio que contenía doxiciclina y el fármaco selectivo puomicina. Este resultado sugirió que (i) el plásmido de prueba 2835, portador de un replicón híbrido con un múltiplo de 20 sitios *tetO* en la posición del grupo de FR, puede replicarse y se mantiene y (ii) la doxiciclina, que interfiere con la unión de ADN de TetR anula el mantenimiento de este plásmido de vector.

Para analizar en profundidad los factores que contribuyen a un mantenimiento (y replicación) estable del replicón híbrido, los inventores utilizaron tres líneas celulares diferentes que expresan proteína no viral (células HEK293 parentales), EBNA1 y ambos EBNA1 más EBNA1:TetR. Para este conjunto de experimentos, se utilizaron dos plásmidos de prueba diferentes que codifican ambos la proteína de fluorescencia roja (mRFP) (Campbell *et al.*, 2002). El plásmido 3154 transporta *oriP* natural mientras que 3155 es un plásmido de prueba con el origen híbrido y 20 sitios *tetO* (Tabla 1). Las tres líneas celulares se transfectaron con los plásmidos de prueba y se seleccionaron sólo con purimicina durante dos a cuatro días hasta que la mayoría de las células adherentes parecieron de color rojo brillante bajo luz UV en el microscopio (día 0, figura 4). La presión selectiva se aligeró y las células se mantuvieron en un medio de cultivo celular normal con o sin doxiciclina (2,0 µg/ml) durante un periodo de 12 días. Ninguna de las células o sólo unas pocas parecieron expresar mRFP en células HEK293 parentales transfectadas con los dos plásmidos de prueba en el punto de tiempo (figura 4: fila superior y datos no mostrados), indicando que ambos plásmidos de prueba se perdieron rápidamente en ausencia de EBNA1 y EBNA1:TetR. En células HEK293 que expresaban EBNA1 y transfectadas con el plásmido de prueba 3154 *oriP wt*, una considerable fracción de células aún expresaron mRFP en presencia o ausencia de doxiciclina (+/- DOX en la figura 4, fila central) después de 12 días. Las células HEK293 que expresaban ambos factores trans y transfectadas con el replicón plásmido 3155 de prueba híbrido fueron positivas de mRFP sólo cuando las células se habían cultivado en ausencia de doxiciclina (figura 4, fila inferior). Este resultado confirmó que el mantenimiento del plásmido de origen híbrido es dependiente de la función de la proteína EBNA1:TetR, la cual no se une a motivos *tetO* en presencia de doxiciclina (datos no mostrados). Como consecuencia, los replicones *oriP* híbridos se pierden de forma abrupta cuando se añade doxiciclina al medio de cultivo celular.

Mantenimiento condicional a largo plazo de plásmidos *oriP* híbridos

La parte amino Terminal en la proteína de fusión EBNA1:TetR se espera que se asocie a cromatina, que es presumiblemente esencial para el mantenimiento del plásmido. Dado que los plásmidos *oriP* naturales se replican y se mantienen de forma estable en presencia de otra proteína quimérica, HMGA1a:EBNA1 (Hung *et al.*, 2001), se expuso que una proteína quimérica nueva que consiste en la secuencia codificante de HMGA1a fusionado al gen de unión a ADN TetR también podría ser funcional. También era evidente que el número de copias del plásmido de tanto el *oriP* natural como el replicón 20*xtetO* híbrido era considerablemente inferior en células cuando se coexpresaban EBNA1 y EBNA1:TetR (figura 3), presumiblemente porque la denominada región de unión (figura 2) localizada tanto en EBNA1 como en EBNA1:TetR provocaba agregaciones heterotípicas e interferencia funcional. De este modo, parecía plausible que una proteína de fusión que consistía en HMGA1a y TetR sortearía estos problemas. Para aumentar la eficacia del sistema, los inventores utilizaron un gen *tetR* dimérico de cadena única (Krueger *et al.*, 2003), que se une a motivos *tetO* como una proteína única en contraste con EBNA1:TetR, que sólo se une como homodímeros.

Un cassette de expresión con el gen de HMGA1a:TetR se integró de forma estable en la línea células parentales HEK293 EBNA1 (figura 2E). Los plásmidos portadores de *oriP wt* (3230, tabla 1) y dos plásmidos replicones diferentes de origen híbrido con 20 (20*xtetO*, 3231) o 40 (40*xtetO*, 3293) copias del motivo *tetO* y una versión desestabilizada de GFP (Li *et al.*, 1998) (Tabla 1) se transfectaron individualmente en estas células, las cuales se pusieron bajo selección de higromicina (80 µg/ml) durante 19 días. En ese punto de tiempo (día 0) se eliminó la selección y

las células se cultivaron con o sin doxiciclina (2,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 12 días. Las células se analizaron mediante FACS para la expresión de GFP en los días 0, 4, 8 y 12. El ADN de peso molecular bajo se aisló en tres puntos de tiempo (días 0, 8 y 12) y se analizó mediante hibridación de transferencia Southern para la presencia de la estructura de los plásmidos de prueba procariota. El ADN también se electroporó en *E. coli* en un experimento de rescate de plásmidos para cuantificar la cantidad de moléculas de ADN plásmido mediante la formación de colonias.

En el día 0 del experimento, los ADN plásmido se podían detectar mediante hibridación de transferencia Southern (figura 5) y el rescate del plásmido en *E. coli* (figura 6). Tal y como se esperaba la mayoría de las agrupaciones de células expresaron GFP (figura 6). Quedó inmediatamente claro que ambos plásmidos híbridos (20xtetO y 40xtetO) se mantuvieron como ADN extracromosómicos con un número de copias más elevado que *oriP* wt (figuras 5 y 6), aunque las células no expresaron cantidades más elevadas de GFP (figura 6). Tras la eliminación de la selección con higromicina, los niveles de expresión de GFP disminuyeron gradualmente en todas las agrupaciones celulares (figura 6). Concomitantemente, las intensidades de señal en los autorradiogramas de transferencia Southern se volvieron más débiles indicando la pérdida espontánea de ADN plásmido tal y como se había descrito anteriormente (Kirchmaier y Sugden, 1995). Muy en contraste con la pérdida espontánea observada, los plásmidos de origen híbrido 3231 y 3293 se perdieron de forma abrupta en presencia de doxiciclina tal y como se observó mediante el análisis de transferencia Southern (figura 5), los números de colonias de plásmidos rescatados de *E. coli*, y los niveles de expresión de GFP (figura 6). La cuantificación de la intensidad de las señales en el análisis de transferencia Southern (figura 5 y datos no mostrados) y números de colonia (figura 6) indicaron que la pérdida de plásmido era inducida en un factor de 50 a 100 en presencia de doxiciclina. La reducción de expresión de GFP no pareció tan drástica, pero se pudo observar una pérdida sustancial de expresión de GFP (figura 6). La doxiciclina tuvo un efecto negligible en el plásmido *oriP* wt 3230 (figuras 5 y 6). En presencia de selección con higromicina, los dos plásmidos híbridos, así como el plásmido de control *oriP* wt, se mantuvieron de forma estable durante la duración total del experimento (31 días, figura 5 y datos no mostrados). De nuevo, el número de copias del plásmido *oriP* wt fue inferior que los dos plásmidos híbridos de los que el plásmido híbrido 40xtetO consiguió consistentemente el mayor número de copias (figura 5).

TABLA 1

Resumen de diferentes plásmidos de vectores genéticos

Elementos plásmidos*	Replicón	Marcador seleccionable	Marcador fenotípico
2832 (12,2)	<i>oriP</i> wt	puromicina	GFP
2835 (12,0)	20xtetO; DS	puromicina	GFP
3154 (12,9)	<i>oriP</i> wt	puromicina	mRFP
3155 (12,7)	20xtetO; DS	puromicina	mRFP
3230 (8,8)	<i>oriP</i> wt	higromicina	GFP
3231 (8,7)	20xtetO; DS	higromicina	GFP
3293 (8,9)	40xtetO; DS	higromicina	GFP
*números en paréntesis indican el tamaño de los plásmidos de vectores genéticos en kbps.			

Referencias

- Aiyar, A., Tyree, C. y Sugden, B. (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J*, 17, 6394-6403.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C., Tufnell, P.S. y Barell, B.G. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-211.
- Baron, U., Gossen, M. y Bujard, H. (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res*, 25, 2723-2729.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. y Tsien, R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7877-7882.

Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. y Hammerschmidt, W. (1999) A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5188-5193.

Deuschle, U., Meyer, W.K. y Thiesen, H.J. (1995) Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol Cell Biol*, 15, 1907-1914.

Gossen, M. y Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 5547-5551.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Mueller, G., Hillen, W. y Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268, 1766-1769.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A. y Cavazzana-Calvo, M. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415-419.

Harrer, M., Luhrs, H., Bustin, M., Scheer, U. y Hock, R. (2004) Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J Cell Sci*, 117, 3459-3471.

Hung, S.C., Kang, M.S. y Kieff, E. (2001) Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1865-1870.

Kieff, E. and Rickinson, A.B. (2001) Epstein-Barr virus and its replication. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. y Straus, S.E. (eds.), *Fields' Virology*. Lippincott - Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. 2, pp. 2511-2573.

Kirchmaier, A.L. y Sugden, B. (1995) Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein- Barr virus. *J. Virol.*, 69, 1280-1283.

Kreppel, F. y Kochanek, S. (2004) Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *J Virol*, 78, 9-22.

Krueger, C., Berens, C., Schmidt, A., Schnappinger, D. y Hillen, W. (2003) Single-chain Tet transregulators. *Nucleic Acids Res*, 31, 3050-3056.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C. y Kain, S.R. (1998) Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, 273, 34970-34975.

Liu, H.S., Feliciano, E.S. y Stambrook, P.J. (1989) Cytochemical observation of regulated bacterial beta-galactosidase gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 9951-9955.

Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M. y Nicolas, J.C. (1999) Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol*, 73, 4385-4392.

Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A., Bode, J. y Lipps, H.J. (1999) A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res*, 27, 426-428.

Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., Humme, S., Kremmer, E., Hammerschmidt, W. y Schepers, A. (2003) Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci*, 116, 3971-3984.

Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I.M., Lipps, H.J. y Knippers, R. (2004) An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *Embo J*, 23, 191-201.

Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F. y Hammerschmidt, W. (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo J*, 20, 4588-4602.

Schonig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K. y Bujard, H. (2002) Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 30, e134.

Sears, J., Kolman, J., Wahl, G.M. y Aiyar, A. (2003) Metaphase chromosome tethering is necessary for the DNA synthesis and maintenance of oriP plasmids but is insufficient for transcription activation by Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol*, 77, 11767-11780.

Sugden, B. y Leight, E.R. (2001) EBV's plasmid replicon: an enigma in cis and trans. *Curr Top Microbiol Immunol*, 258, 3-11.

Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H. y Hillen, W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7963-7968.

White, R.E., Wade-Martins, R. y James, M.R. (2001) Sequences adjacent to oriP improve the persistence of Epstein-Barr virus-based episomes in B cells. *J Virol*, 75, 11249-11252.

White, R.E., Wade-Martins, R. y James, M.R. (2002) Infectious delivery of 120-kilobase genomic DNA by an Epstein-Barr virus amplicon vector. *Mol Ther*, 5, 427-435.

Yao, F., Svensjo, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C. y Eriksson, E. (1998) Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 9, 1939-1950.

Yates, J.L. y Camiolo, S.M. (1988) Dissection of DNA replication and enhancer activation functions of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Cancer Cells*, 6, 197-205.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos que no son patentes citados en la descripción

• **AIYAR, A.; TYREE, C.; SUGDEN, B.** The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J*, 1998, vol. 17, 6394-6403

• **BAER, R.; BANKIER, A.T.; BIGGIN, M.D.; DEININGER, P.L.; FARRELL, P.J.; GIBSON, T.J.; HATFULL, G.; HUDSON, G.S.; SATCHWELL, S.C.; SEGUIN, C.** DNA sequence and expresión of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, vol. 310, 207-211 [0069]

• **BARON, U.; GOSSEN, M.; BUJARD, H.** Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25, 2723-2729 [0069]

• **CAMPBELL, R.E.; TOUR, O.; PALMER, A.E.; STEINBACH, P.A.; BAIRD, G.S.; ZACHARIAS, D.A.; TSIEN, R.Y.** A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, vol. 99, 7877-7882 [0069]

• **DELECLUSE, H.J.; PICH, D.; HILSENDEGEN, T.; BAUM, C.; HAMMERSCHMIDT, W.** A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, vol. 96, 5188-5193 [0069]

• **DEUSCHLE, U.; MEYER, W.K.; THIESEN, H.J.** Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol Cell Biol*, 1995, vol. 15, 1907-1914 [0069]

• **GOSSEN, M.; BUJARD, H.** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 5547-5551 [0069]

• **GOSSEN, M.; FREUNDLIEB, S.; BENDER, G.; MUELLER, G.; HILLEN, W.; BUJARD, H.** Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, vol. 268, 1766-1769 [0069]

• **HACEIN-BEY-ABINA, S.; VON KALLE, C.; SCHMIDT, M.; MCCORMACK, M.P.; WULFFRAAT, N.; LEBOULCH, P.; LIM, A.; OSBORNE, C.S.; PAWLIUK, R.; MORILLON, E.** LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients alter gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, vol. 302, 415-419 [0069]

• **HARRER, M.; LUHRS, H.; BUSTIN, M.; SCHEER, U.; HOCK, R.** Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J Cell Sci*, 2004, vol. 117, 3459-3471 [0069]

• **HUNG, S.C.; KANG, M.S.; KIEFF, E.** Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, vol. 98, 1865-1870 [0069]

• Epstein-Barr virus and its replication. **KIEFF**, E.; **RICKINSON**, A.B. Fields' Virology. Lippincott - Williams & Wilkins, 2001, vol. 2, 2511-2573 [0069]

• **KIRCHMAIER**, A.L.; **SUGDEN**, B. Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, 1995, vol. 69, 1280-1283 [0069]

• **KREPPPEL**, F.; **KOCHANEK**, S. Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *J Virol*, 2004, vol. 78, 9-22 [0069]

• **KRUEGER**, C.; **BERENS**, C.; **SCHMIDT**, A.; **SCHNAPPINGER**, D.; **HILLEN**, W. Single-chain Tet trans-regulators. *Nucleic Acids Res*, 2003, vol. 31, 3050-3056 [0069]

• **LI**, X.; **ZHAO**, X.; **FANG**, Y.; **JIANG**, X.; **DUONG**, T.; **FAN**, C.; **HUANG**, C.C.; **KAIN**, S.R. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 34970-34975

• **LIU**, H.S.; **FELICIANO**, E.S.; **STAMBROOK**, P.J. Cytochemical observation of regulated bacterial beta-galactosidase gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, vol. 86, 9951-9955 [0069]

• **MARECHAL**, V.; **DEHEE**, A.; **CHIKHI-BRACHET**, R.; **PILOT**, T ; **COPPEY-MOISAN**, M.; **NICOLAS**, J.C. Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol*, 1999, vol. 73, 4385-4392 [0069]

• **PIECHACZEK**, C.; **FETZER**, C.; **BAIKER**, A.; **BODE**, J.; **LIPPS**, H.J. A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res*, 1999, vol. 27, 426-428 [0069]

• **RITZI**, M.; **TILLACK**, K.; **GERHARDT**, J.; **OTT**, E.; **HUMME**, S.; **KREMMER**, E.; **HAMMERSCHMIDT**, W.; **SCHEPERS**, A. Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci*, 2003, vol. 116, 3971-3984 [0069]

• **SCHAARSCHMIDT**, D.; **BALTIN**, J.; **STEHLE**, I.M.; **LIPPS**, H.J.; **KNIPPERS**, R. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *Embo J*, 2004, vol. 23, 191-201 [0069]

• **SCHEPERS**, A.; **RITZI**, M.; **BOUSSET**, K.; **KREMMER**, E.; **YATES**, J.L.; **HARWOOD**, J.; **DIFFLEY**, J.F.; **HAMMERSCHMIDT**, W. Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo J*, 2001, vol. 20, 4588-4602 [0069]

• **SCHONIG**, K.; **SCHWENK**, F.; **RAJEWSKY**, K.; **BUJARD**, H. Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 2002, vol. 30, e134 [0069]

• **SEARS**, J.; **KOLMAN**, J.; **WAHL**, G.M.; **AIYAR**, A. Metaphase chromosome tethering is necessary for the DNA synthesis and maintenance of oriP plasmids but is insufficient for transcription activation by Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol*, 2003, vol. 77, 11767-11780 [0069]

• **SUGDEN**, B.; **LEIGHT**, E.R. EBV's plasmid replicon: an enigma in cis and trans. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, vol. 258, 3-11 [0069]

• **URLINGER**, S.; **BARON**, U.; **THELLMANN**, M.; **HASAN**, M.T.; **BUJARD**, H.; **HILLEN**, W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, vol. 97, 7963-7968 [0069]

• **WHITE**, R.E.; **WADE-MARTINS**, R.; **JAMES**, M.R. Sequences adjacent to oriP improve the persistence of Epstein-Barr virus-based episomes in B cells. *J Virol*, 2001, vol. 75, 11249-11252 [0069]

• **WHITE**, R.E.; **WADE-MARTINS**, R.; **JAMES**, M.R. Infectious delivery of 120-kilobase genomic DNA by an Epstein-Barr virus amplicon vector. *Mol Ther*, 2002, vol. 5, 427-435 [0069]

• **YAO**, F.; **SVENSJO**, T.; **WINKLER**, T.; **LU**, M.; **ERIKSSON**, C.; **ERIKSSON**, E. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 1998, vol. 9, 1939-1950 [0069]

• **YATES**, J.L.; **CAMIOLO**, S.M. Dissection of DNA replication and enhancer activation functions of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Cancer Cells*, 1988, vol. 6, 197-205 [0069]

REIVINDICACIONES

1. Sistema de vector genético condicional que comprende los siguientes elementos:

- a) un vector portador de un elemento activo en *cis* y una o más secuencias codificantes y/o no codificantes, y
- b) un factor activo en *trans* que tiene un dominio de unión a ADN capaz de unirse a una región del elemento activo en *cis* y un dominio capaz de mantener la proteína en el núcleo de una célula diana (mantenimiento en el sentido de estar unido al esqueleto de cromatina)

caracterizado

en que se selecciona la región del elemento activo en *cis* y el dominio de unión a ADN del factor activo en *trans* capaz de unirse a la región del elemento activo en *cis*, de manera que el mantenimiento nuclear de dicho vector portador del elemento activo en *cis* en una célula diana puede estar regulado por la adición de un agente capaz de interferir en la unión de dicho factor activo en *trans* a dicho elemento activo en *cis*.

2. Sistema de vector según la reivindicación 1, en el que el elemento activo en *cis* deriva de un elemento activo en *cis* natural, en el que la región dispuesta para la unión de dicho elemento activo en *cis* al correspondiente factor activo en *trans* natural está sustituido por una secuencia de ADN heteróloga, y que el factor activo en *trans* deriva de un factor activo en *trans* natural, en el que el dominio de unión a ADN capaz de unirse a una región del elemento activo en *cis* está sustituido por una secuencia de aminoácidos heteróloga.

3. Sistema de vector según la reivindicación 2, en el que el elemento activo en *cis* es natural y se selecciona del origen plásmido de replicación de ADN de virus de Epstein-Barr, denominado *oriP*, o de motivos de ADN a los que los factores activos en *trans* se unen específicamente de sitio, tal como un operador *lacO*, sitios de unión a GAL4, OR1/2, operador *tetO* u operador *lexA*.

4. Sistema de vector según las reivindicaciones 1-3, en el que el dominio de unión a ADN del factor activo en *trans* se selecciona de EBNA1, represor LacI, proteína GAL4, proteína Cro, la proteína LexA o el represor Tet.

5. Vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio capaz de mantener el factor activo en *trans* en el núcleo de una célula diana se selecciona de EBNA1, Histona H1 o HMGA1a.

6. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la región de unión del elemento activo en *cis* contiene uno o más sitios *tetO* (operador tet), *lacO* (operador lac) u otros sitios operadores derivados de elementos activos en *cis* no presentes en la célula diana del vector genético.

7. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la región de unión del elemento activo en *cis* consiste en al menos de 5 x sitios *tetO* a 200 x sitios *tetO*, preferiblemente de 10 x sitios *tetO* a 100 x sitios *tetO*, más preferiblemente de 20 a 40 x sitios *tetO* o al menos de 5 x sitios *lacO* a 200 x sitios *lacO*, preferiblemente de 10 x sitios *lacO* a 100 x sitios *lacO*, preferiblemente de 20 a 40 sitios x *lacO*.

8. Sistema de vector según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el dominio de unión a ADN del factor activo en *trans* es TetR (Represor Tet) o LacI (Represor Lac).

9. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el factor activo en *trans* deriva de EBNA1, donde las secuencias carboxi terminal se sustituyeron por TetR o LacI.

10. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el factor activo en *trans* es HMGA1 o histona H1 fusionados a TetR o LacI.

11. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector es un plásmido.

12. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia codificante transportada en el vector se selecciona del grupo que consiste en antígenos, proteínas marcadoras seleccionables y fenotípicas y genes que complementan un defecto genético somático en la célula o células diana del vector genético.

13. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de interferencia se selecciona de doxiciclina, tetraciclina, isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG), iones de metales complejantes, preferiblemente Zn^{2+} , u hormonas.

14. Sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que todos los elementos de dichos sistema de vector están presentes en un único vector.

15. Célula huésped que ha sido transfectada con un vector según una o más de las reivindicaciones 1-14.

ES 2 297 315 T3

16. Célula huésped según la reivindicación 15, que es una célula madre humana o animal, preferiblemente una célula madre hematopoyética, una célula T o una célula B, de la que se excluyen las células madre embrionarias humanas y las células de líneas germinales humanas.

5 17. Preparación combinada que comprende:

a) el sistema de vector según una o más de las reivindicaciones anteriores; y

10 b) el agente de interferencia tal y como se ha definido en la reivindicación 1 ó 13.

18. Preparación combinada, en la que los componentes a) y b) están destinados a la administración posterior.

19. Composición farmacéutica que contiene el sistema de vector según una o más de las reivindicaciones 1-14, una
15 célula huésped según la reivindicación 15 ó 16 o una preparación combinada según la reivindicación 17 ó 18, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20. Uso del sistema de vector según una o más de las reivindicaciones 1-14 o la composición farmacéutica según
la reivindicación 19 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia, la diabetes, la
artritis reumatoide, la inmunodeficiencia genética, y la enfermedad de injerto contra huésped.
20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

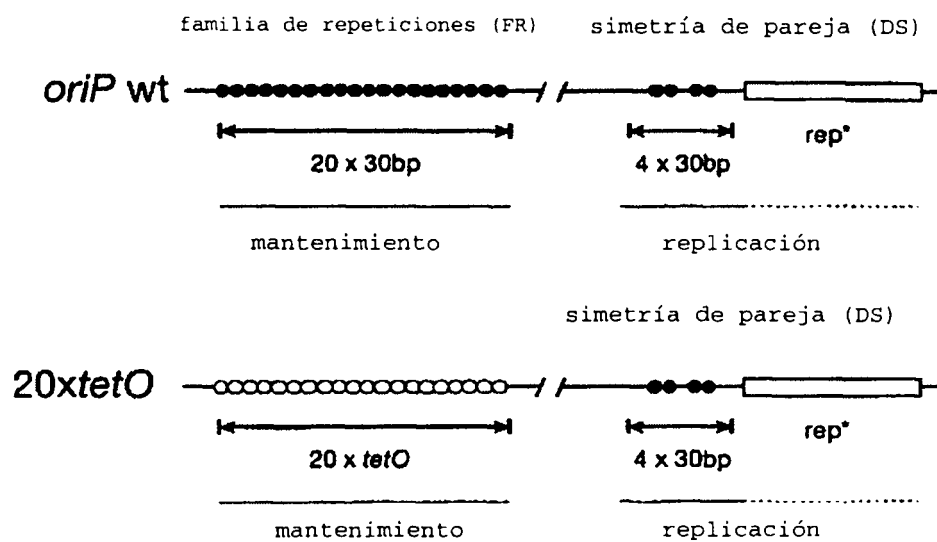
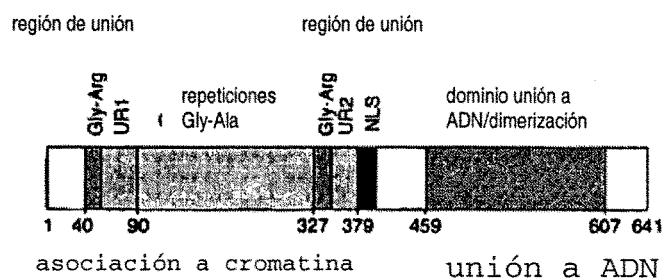
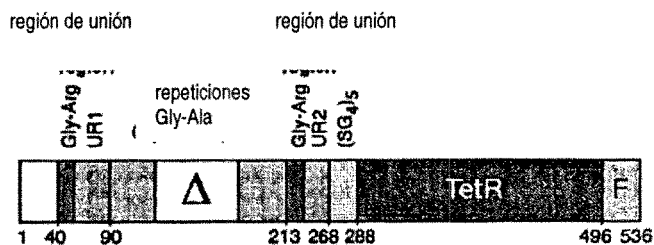


FIGURA 2

A EBNA1 natural



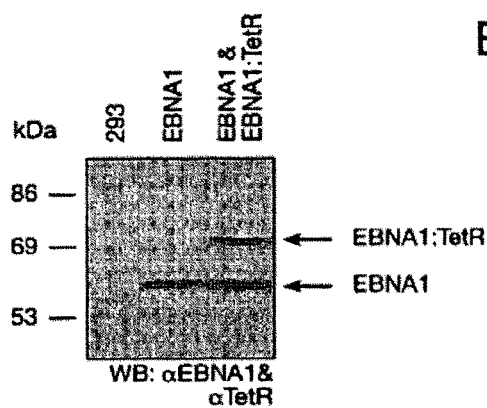
B EBNA1:TetR



C TetR:TetR:HMGA1a



D



E

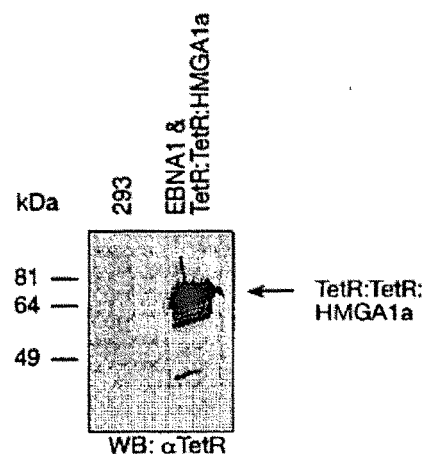


FIGURA 3

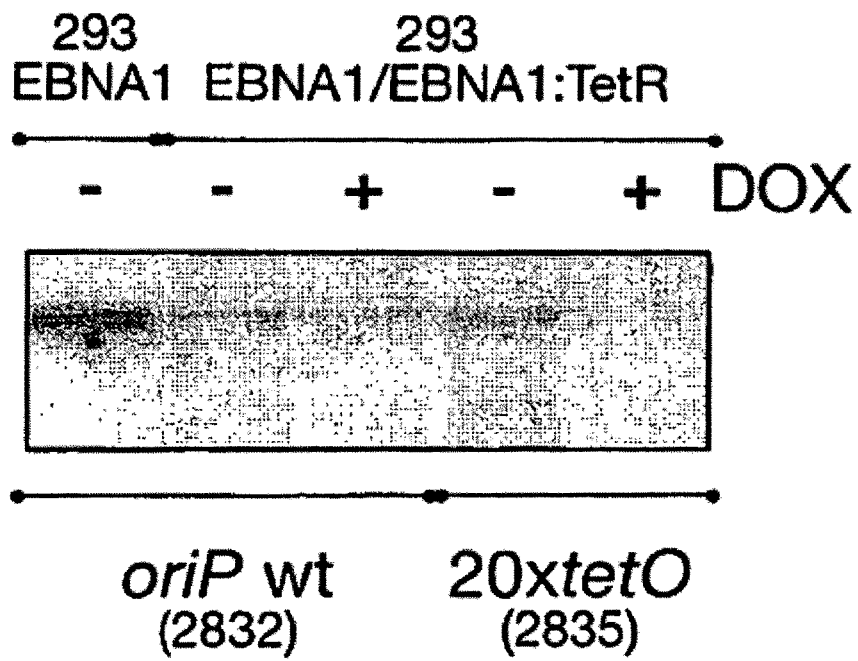


FIGURA 4

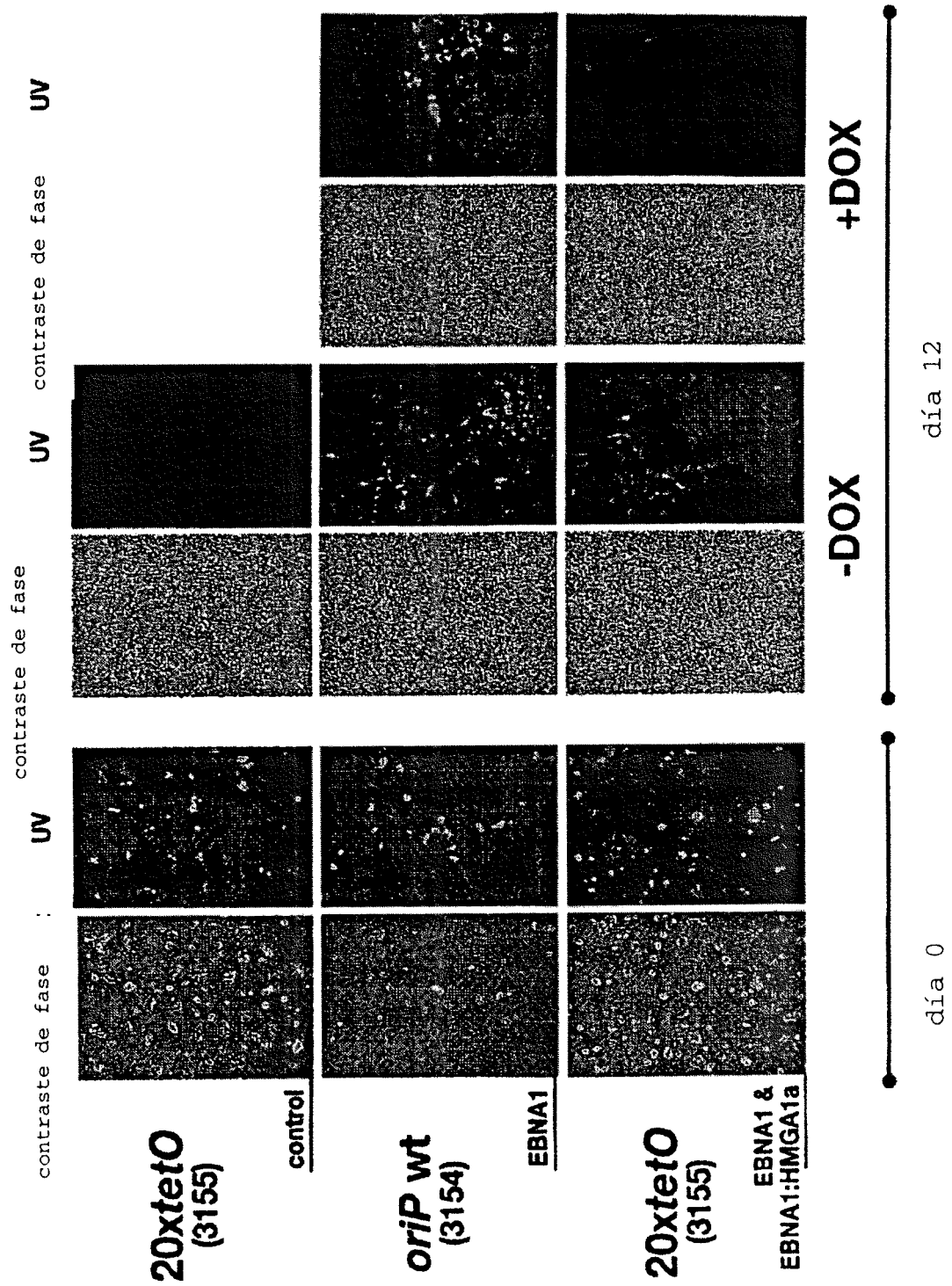


FIGURA 5

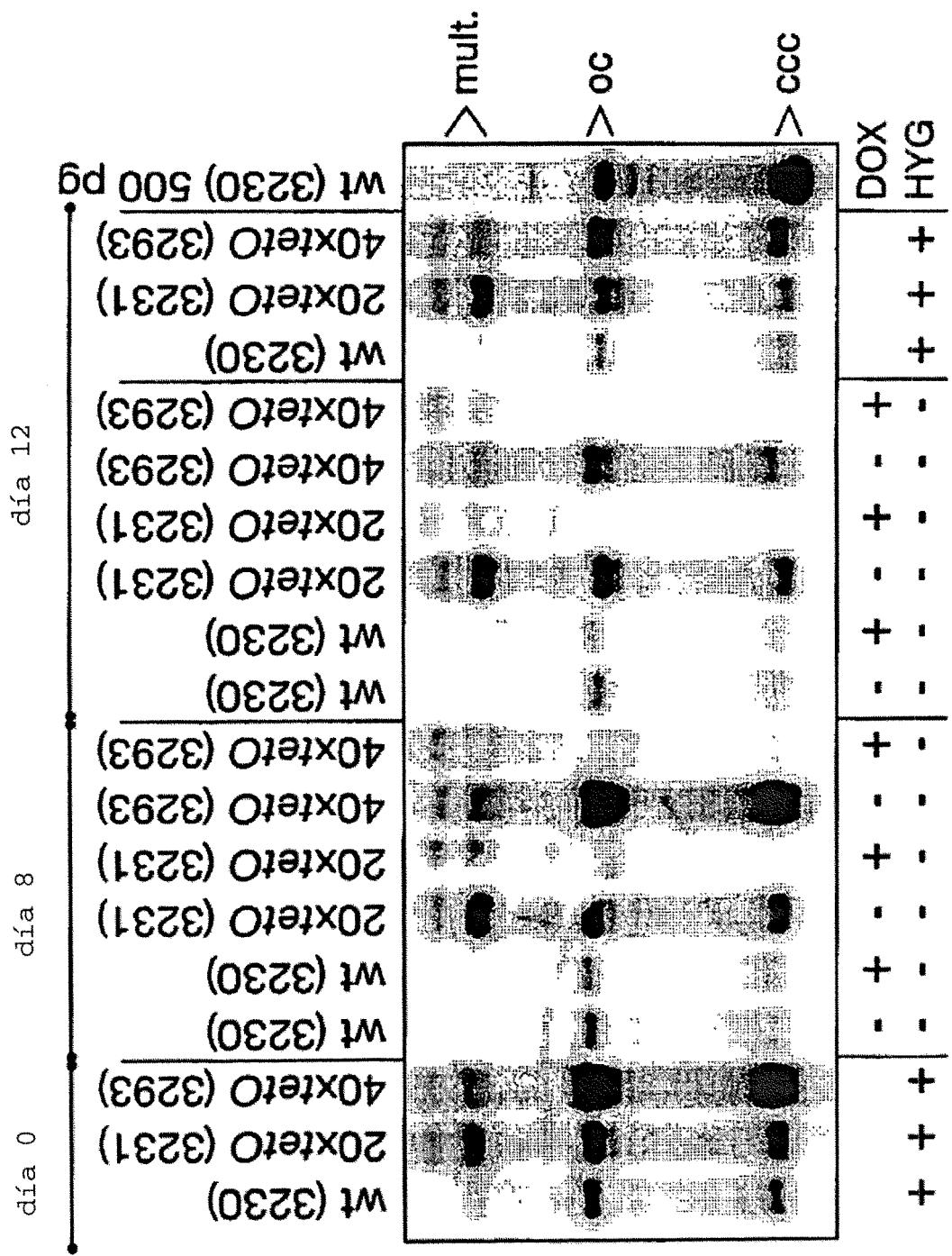


FIGURA 6

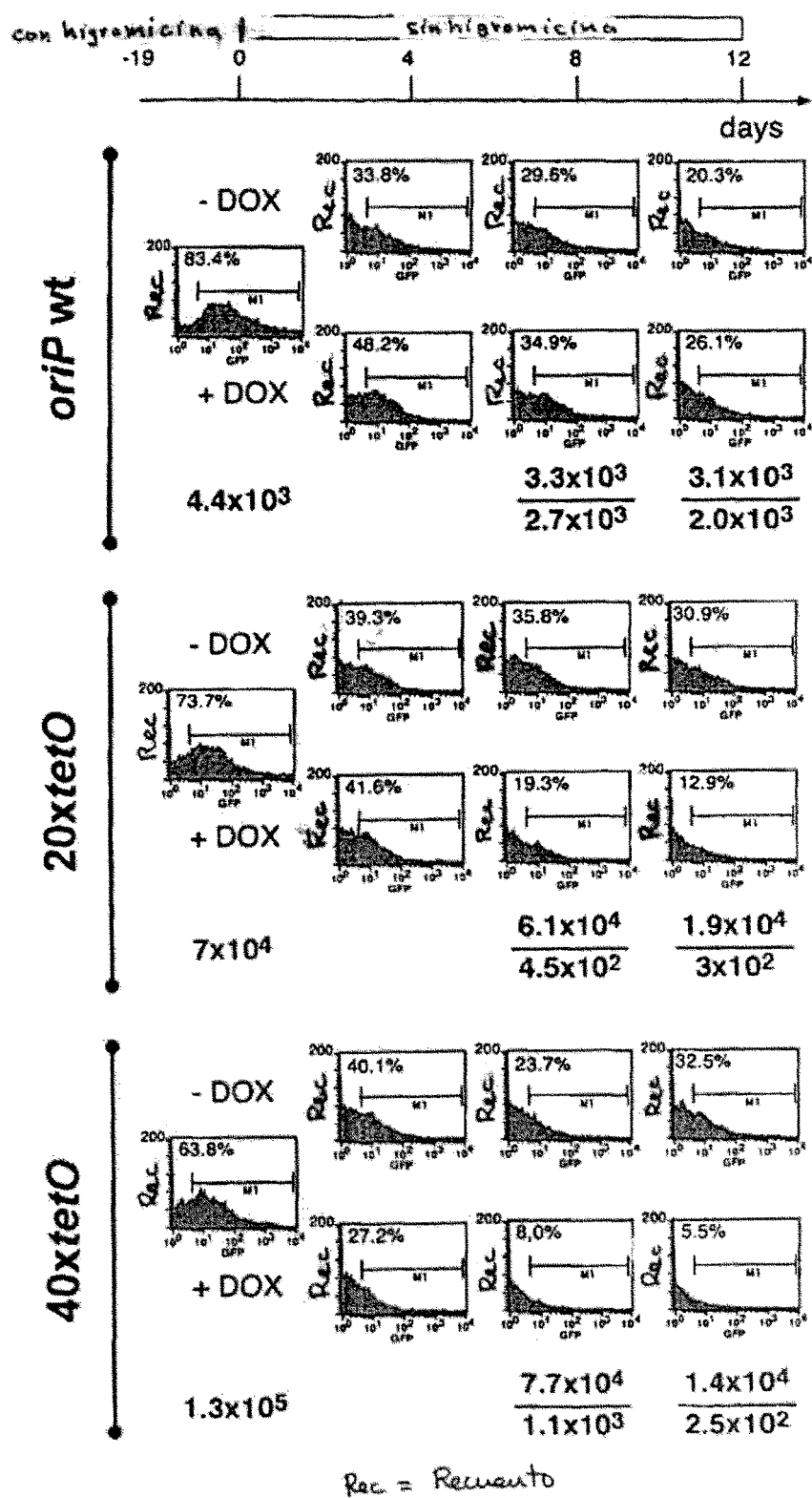


FIGURA 7

