



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 300 200**

② Número de solicitud: 200602688

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **18.10.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2008**

Fecha de la concesión: **13.04.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

⑰ Titular/es: **Universitat Autònoma de Barcelona
Area I+D-Edifici A - Campus Universitari, s/n
08193 Bellaterra, Barcelona, ES
Institució Catalana Recerca i Estudis Avançats**

⑱ Inventor/es: **Chillón Rodríguez, Miguel;
Danos, Olivier;
Gil Guiñón, Estel;
Bosch Merino, Assumpció y
Alba Fernández, Raúl**

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Transposón *Hsmar2* y su uso en la generación de vectores útiles en terapia génica somática.**

㉖ Resumen:

Transposón *Hsmar2* y su uso en la generación de vectores útiles en terapia génica somática. La invención se refiere a la generación del primer transposón activo humano de ADN, el transposón *Hsmar2*, así como al análisis de su actividad en células de mamífero y en particular en células humanas. Concretamente, la invención se refiere a la caracterización funcional de *Hsmar2* y a su capacidad de transponer fragmentos de ADN que se encuentran flanqueados por las secuencias TR de *hsmar2* de un genoma donante a un genoma receptor.

ES 2 300 200 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Transposón *Hsmar2* y su uso en la generación de vectores útiles en terapia génica somática.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a la generación del primer transposón activo humano de ADN, el transposón *Hsmar2*, así como al análisis de su actividad en células de mamífero y en particular en células humanas. Concretamente, la invención se refiere a la caracterización funcional de *Hsmar2* y a su capacidad de transponer fragmentos de ADN que se encuentran flanqueados por las secuencias TR de *Hsmar2* de un genoma donante a un genoma receptor.

Antecedentes de la invención

Las transposasas son enzimas mobilizadores de ADN, destacando los de la superfamilia Tc1/*mariner* por su amplia distribución en animales, incluyendo insectos, vertebrados y mamíferos. La estructura de los transposones mariner es simple pues están formados por una única pauta de lectura abierta de unos 1300 pares de bases flanqueada por dos secuencias terminales (ITR = Inverted Terminal Repeats). Hasta el momento, sólo se han reportado dos transposones activos: *Mos1* (de *Drosophila mauritiana*) y *Himar1* (de *Haemotobia irritans*). Así, aunque se han descrito otros transposones en distintas especies, todos contienen mutaciones inactivantes múltiples debido a fenómenos de inactivación vertical (1).

Los transposones mariner utilizan un mecanismo de “cortar y pegar” en el que se excinde el transposón de su localización original y se inserta en nuevas localizaciones del genoma. Para llevar a cabo el proceso sólo se necesitan dos elementos: una transposasa activa *in trans* y un fragmento de ADN flanqueado por dos secuencias ITR. Los fragmentos movilizados se integran siempre en un dinucleótido TA, el cual se duplica después de la inserción. Mediante estudios de transposición *in vitro* con transposasas purificadas se sabe que el proceso de transposición es independiente de factores nucleares (2). Sin embargo, la eficiencia final de transposición puede ser aumentada o disminuida por factores celulares específicos y así las transposasas descritas anteriormente muestran un baja eficiencia en mamíferos.

Hasta el momento se han descrito dos secuencias consensus de transposones mariner humanos. Ambas secuencias *Hsmar1* (3) y *Hsmar2* (4) se detectaron por análisis computacional del genoma humano. La secuencia consensus inicial de *Hsmar2* fue posteriormente refinada, y consta de dos secuencias ITR de 32 pb, y una secuencia de 1301 pares de bases (pb) que codifica para una transposasa de 351 aminoácidos que muestra un 38% de homología con otros transposones mariners de la misma familia (5) y que contiene en las posiciones (Asp₁₆₀Asp₂₅₄Asp₂₈₉), el dominio ácido AspAsp_(34/35)Asp característico de los transposones mariner.

Utilizando la secuencia consensus de *Hsmar2* (número de acceso=U49974), se han detectado por PRINS (prime *in situ* labelling) más de 100 secuencias *Hsmar2*-like en el genoma humano (6). Sin embargo, todas las copias analizadas contienen numerosas mutaciones, deleciones, pequeñas y grandes inserciones incluso de elementos *Alu*. Las copias tienen una homología de 85-90% con la secuencia consensus y una media de 12 mutaciones por kilobase. Estos datos indican que las copias *Hsmar2*-like son el remanente inactivo de un elemento mariner que entró en el linaje humano hace unos 80 millones de años.

Asimismo, se ha publicado recientemente la reconstrucción de una transposasa mariner activa “Sleeping Beauty” a partir de una secuencia consensus de los Salmónidos *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss*, mediante la eliminación por mutagénesis dirigida de las mutaciones inactivantes de su secuencia (7). Esta Sleeping Beauty *de novo* muestra una elevada eficiencia en determinados tipos celulares humanos. Aún y así es importante resaltar que aunque los transposones mariner son relativamente autónomos, su actividad y eficiencia está influenciada por la presencia/ausencia de factores celulares específicos. Por ello es posible que el sistema más eficiente para mediar un proceso integrativo en mamíferos, y especialmente en células humanas, sea mediante la utilización de una transposasa humana como la *Hsmar2*. Sin embargo, debido a que todos los transposones *Hsmar2* presentes en el genoma humano contienen numerosas mutaciones inactivantes es necesario generar primero *in vitro* un transposón que contenga exactamente la secuencia nucleotídica de la secuencia consensus (4) y segundo analizar en células humanas que el transposón es activo y capaz de transponer fragmentos de ADN flanqueados por las secuencias ITR de *Hsmar2* entre un genoma donante y un genoma receptor.

La capacidad de integrar secuencias de ADN en el genoma celular tiene un gran interés en el campo de la terapia génica y mas específicamente para el tratamiento de enfermedades crónicas para las cuales es necesaria la expresión permanente del gen terapéutico. Actualmente la expresión permanente se consigue mediante la utilización de vectores integrativos como los virus adenoasociados y los retrovirus ya sean derivados de MMLV (virus de la leucemia murina Moloney) o de HIV (virus del sida). Sin embargo, numerosos grupos de investigación consideran muy conveniente utilizar adenovirus como vectores gracias a que infectan eficientemente una amplia variedad de tipos celulares (quiescentes y en división) y a tener una capacidad máxima de 36 Kb lo cual resulta ventajoso respecto a otros vectores porque la capacidad máxima de los otros vectores virales existentes, que tienen una elevada eficiencia, varía entre las 3'5 kilobases y las 12 kilobases. Por tanto, este vector viral multiplica por 3-10 el tamaño de los genes terapéuticos que puede contener en su genoma. Sin embargo, los adenovirus no se integran y para obtener una expresión prolongada del transgén es necesario administrar el vector en repetidas dosis, lo que genera una respuesta inmune contra el vector y por lo tanto, conlleva la no expresión del transgén en administraciones posteriores (8). Una solución se basa en generar

adenovirus con capacidad integrativa que eviten la necesidad de readministrar el vector. La utilización de transposones mariner para generar adenovirus integrativos no es nueva. Ya en 1998 se utilizó una de las dos transposasas activas, *Himar1*, y se demostró que mediaba procesos de integración en células de mamíferos cuando se utilizaba en un adenovirus (9). Posteriormente, se ha utilizado Sleeping Beauty (SB) (otro transposón mariner) para generar adenovirus integrativos (10). Sin embargo, ninguno de estos transposones es de mamífero, y presentan una baja eficiencia en la integración de secuencias dentro del genoma humano *in vivo* (alrededor del 3-5%), incluso en tipos celulares de alta tasa de división celular como hepatocitos (11) y keratinocitos (12). Es por ello, que la utilización del transposón *Hsmar2* podría aumentar el potencial terapéutico en humanos de adenovirus integrativos y ser utilizado en estrategias de terapia génica para el tratamiento de enfermedades crónicas.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

En la actualidad se conoce un número muy reducido de transposones de ADN activos, la mayoría de los cuales son de invertebrados. Tan sólo se conoce un transposón de ADN de la familia mariner que sea activo en vertebrados (Sleeping Beauty, de Salmónidos), pero hay ningún transposón de mamíferos, incluidos los humanos. Es importante resaltar que aunque los transposones mariner son relativamente autónomos, su actividad y eficiencia está influenciada por la presencia/ausencia de factores celulares específicos. Por ello pensamos que el transposón más eficiente para mediar un proceso integrativo en mamíferos, y especialmente en células humanas, sería mediante la utilización de una transposasa humana, y más específicamente *Hsmar2* ya que se conocía la secuencia consensus.

Así pues, la invención se refiere a la generación de *Hsmar2*, un transposón de ADN humano activo y la posterior demostración y caracterización de su actividad en células humanas.

Descripción de las figuras

Figura 1

Muestra los esquemas de los plásmidos utilizados una vez se han separado la transposasa *Hsmar2* de las secuencias ITR que la flanquean. En la, el plásmido pCMV-*Hsmar2*, el gen *Hsmar2* está bajo la acción del promotor viral constitutivo fuerte (CMV) del citomegalovirus y como secuencia de poliadenilación tiene la señal PolyA del virus SV40. En 1b, el plásmido pITR-gen marcador, contiene un cassette de expresión eucariota que contiene un gen marcador (GFP, Bgal, Neo^R, etc) flanqueado por las secuencias ITR reconocidas por *Hsmar2*.

Figura 2

Muestra como la transposasa *Hsmar2* es activa en células humanas y que el mayor número de clones se obtiene cuando se transfectan células HeLa conjuntamente con los plásmidos que contienen la transposasa (pCMV-*Hsmar2*) y el transposón (pITR-Neo).

Figura 3

Muestra que para que la transposición ocurra, la transposasa debe ser activa, ya que cuando se utiliza una transposasa no activa (*Hsmar2*-AF), la transposición no ocurre. Asimismo, demuestra que a una cantidad fija de transposasa *Hsmar2* activa, a mayor cantidad de transposones ITR-Neo, mayor número de eventos de transposición.

Figura 4

Muestra que existe un efecto dosis:respuesta y que con una cantidad fija de de transposones ITR-Neo, a mayor cantidad de transposasa *Hsmar2* activa, mayor número de eventos de transposición.

De izquierda a derecha se observan tres grupos:

1. Grupo control.
2. Grupo tratado con 0,4 μ g de pTR-neo:
 - o Columna negra: control.
 - o Columna con rayas verticales: 0,1 μ g de *Hsmar2*.
 - o Columna con puntos: 1,5 μ g de *Hsmar2*.
 - o Columna con rayas oblicuas: 4,5 μ g de *Hsmar2*.

ES 2 300 200 B1

3. Grupo tratado con 4,0 μg de pTR-neo:

- o Columna negra: control.
- o Columna con rayas verticales: 0,1 μg de *Hsmar2*.
- o Columna con puntos: 1,5 μg de *Hsmar2*.
- o Columna con rayas oblicuas: 4,5 μg de *Hsmar2*.

Figura 5

Muestra como la interacción *Hsmar2*: ITR es específica. Así, en 5a, transfectando células con la transposasa *Hsmar2* solo se observa transposición cuando los ITR son los de *Hsmar2*, pero no cuando son de otro elemento mariner como Sleeping Beauty. En 5b, transfectando células con el gen Neo^R flanqueado por los ITR de *Hsmar2* solo se observa transposición cuando la transposasa es *Hsmar2*, pero no cuando es Sleeping Beauty.

Figura 6

Muestra el esquema del plásmido que contiene la transposasa quimera GFP:*Hsmar2* que permite estudios de localización intracelular. La transposasa quimera GFP:*Hsmar2* está bajo la acción del promotor viral constitutivo fuerte (CMV) del citomegalovirus y como secuencia de poliadenilación tiene la señal PolyA del virus SV40.

Figura 7

Muestra como las transposasa quimera GFP:*Hsmar2* es producida en células humanas y como su tamaño es el esperado, y mayor que el de la proteína GFP de la que deriva. Para ello se extrajo proteína total de células HEK-293 transfectadas con GFP o con GFP:*Hsmar2*, se corrió en un gel de acrilamida y se detectó GFP mediante la utilización de un anticuerpo anti-GFP.

De izquierda a derecha se presentan las siguientes columnas:

1. Células 293 QB transfectadas con pEGFP-C1.
2. Marcador.
3. Células 293 QB transfectadas con *Hsmar2*-GFP.

Figura 8

Muestra la localización intracelular de *Hsmar2* en células HeLa y en células HEK-293. Las células fueron analizadas por microscopia de fluorescencia 24 después de la transfección. En células HeLa la localización de *Hsmar2* es nuclear, mientras que en células HEK-293 es citoplasmática.

Figura 9

A)

◆ p*Hsmar2*-GFP 24 horas.

■ pCMV-GFP 24 horas.

B)

◆ p*Hsmar2*-GFP 24 horas.

■ pCMV-GFP 24 horas.

X p*Hsmar2*-GFP 72 horas.

● pCMV-GFP 72 horas.

Muestra como la expresión de *Hsmar2* en células HeLa correlaciona con toxicidad a lo largo del tiempo, mientras que esto no pasa en células HEK-293. En un análisis temprano, a las 24 post-transfección, cuando no es aún posible observar toxicidad por microscopia óptica, los niveles de células que expresan GFP son muy similares en células HeLa y células HEK-293. Sin embargo, en un análisis tardío, a las 72 post-transfección, cuando ya es posible observar toxicidad por microscopia óptica, en células HeLa, los niveles de células GFP-positivas son mucho menores que a las

ES 2 300 200 B1

24 horas, indicando que las células que expresaban GFP:*Hsmar2* han muerto. Por el contrario, en células HEK-293 los niveles de células GFP-positivas no solo disminuyen sino que aumentan con respecto a las 24 horas. En el eje se abscisas se muestra los μg de GFP plasmídico expresado.

5 Descripción detallada de la invención

Inicialmente partimos de la secuencia consenso de *Hsmar2* (número de acceso=U49974) y analizamos la base de datos de ADN humano de GenEmbl mediante el programa BLATN 2.0a19MO-WashU. Después de un primer análisis, las secuencias repetidas y las de menos de 600 nucleótidos fueron eliminadas. Se seleccionaron 71 secuencias con una alta homología con U49974 y que contuvieran al menos una de las secuencias ITR. Para el análisis de alineamiento de las secuencias la profundidad mínima fue de 16 y la máxima de 41 y se utilizó la regla de la Mayoría "Alignment by Majority Rule". Dicha regla se basa en que para cada posición se escoge el nucleótido que esté más representado en cada una de las secuencias estudiadas y alineadas. En nuestro primer análisis detectamos discrepancias entre nuestra secuencia consenso y la secuencia consenso de *Hsmar2*. Estas diferencias se debían principalmente a cambios en el dinucleótido CG a dinucleótidos CA o TG. *In vivo*, la causa principal de estos cambios es debido a la hipermutabilidad del dinucleótido CG causada por su metilación. Así, se decidió reintroducir el dinucleótido CG en todos los casos de discrepancia entre nuestra secuencia consenso y la secuencia consenso para *Hsmar2* reportada por Roberston (U49974). Es necesario destacar que la mayoría, pero no todos los cambios reintroducidos coincidían con la secuencia consenso U49974 de *Hsmar2*. En particular los cambios reintroducidos fueron en las posiciones:

32/33; 89/90; 207/208; 327/328; 342/343; 347/348; 366/367; 371/372; 395/396; 417/418; 438/439; 441/442; 540/541; 556/557; 561/562; 642/643; 667/668; 683/684; 754/755; 759/760; 841/842; 903/904; 907/908; 941/942; 987/988; 996/997; 1191/1192

Otras discrepancias observadas con respecto a U49974 fueron:

- Cambio de Citosina a Timina en la posición 259. Ello implica un cambio de Treonina-26 a Isoleucina-26
- Inserción de una Timina en la posición 1277, en el ITR-3'.
- Cambio de Citosina a Timina en la posición 1280 de nuestra secuencia consenso (o la posición 1281 de U49974), en el ITR-3'.

Así, después del análisis confirmamos que el transposón *Hsmar2* tiene 1301 pb SEQ ID NO: 1, en la cual, leyendo las posiciones nucleotídicas en dirección 5' \rightarrow 3' se pueden observar diferentes segmentos dentro de la secuencia:

- ✓ 1-31: ITRs.
- ✓ 32-181: región no codificante.
- ✓ 182-184: codon start.
- ✓ 1235-1237: codon stop.
- ✓ 1238-1269: región no codificante.
- ✓ 1270-1301: ITRs
- ✓ 258, 1276 y 1280: cambios respecto a la secuencia consenso U49974, de ellos, C258T esta en la región codificante e implica el cambio de Treonina-26 a Isoleucina-26, mientras que los otros dos están dentro de la secuencia ITR-3': el primero es la inserción de una Timina en la posición 1276, y el segundo un cambio de Citosina a Timina en la posición 1280 de nuestra secuencia consenso (o la posición 1281 de U49974).

Dicha secuencia presenta una pauta de lectura abierta de 1052 pb que codifica los 351 aminoácidos de la transposasa, y contiene el dominio ácido AspAsp_(34/35)Asp característico de los transposones mariner en las posiciones (Asp₁₆₀Asp₂₅₄Asp₂₈₉) (SEQ ID NO: 2). Asimismo, determinamos que los dos elementos ITR flanqueantes tienen una longitud de 31 pb, y que entre el ITR-5' y el ATG (codon START) de la transposasa hay una región no codificante de 150 pb que posiblemente conformen el promotor que dirige la expresión de *Hsmar2*; y que entre el codon STOP y el ITR-3' hay una región no codificante de 32 pb que contiene la señal de poliadenilación.

Finalmente analizamos utilizando la regla de la Mayoría las secuencias que flanqueaban las copias de *Hsmar2* presentes en el genoma humano. Así, detectamos el clásico dinucleótido TA justo flanqueando por el exterior a las secuencias ITR, pero además, también pudimos detectar una secuencia consenso de las zonas flanqueantes de *Hsmar2*, que podría aportar indicios de una secuencia más específica de la zona de inserción. Los números indican la frecuencia en que se encontraban para esa posición. Esta secuencia consenso es:

A_{18/28}(T/A)_{22/28}A_{19/28}T_{24/28}A_{20/28}--5'-Transposón-3'--T_{26/29}A_{22/29}T_{18/29}(A/T)_{18/29}T_{21/29}

ES 2 300 200 B1

Asimismo, el análisis de una zona de 30 nucleótidos de cada secuencia flanqueante (65% de AT), muestra que el *Hsmar2* se insertaba preferentemente en zonas ricas en el dinucleótido AT.

Debido a que la secuencia consensus no se encuentra dentro del genoma humano ya que todos los transposones identificados contenían múltiples mutaciones, decidimos generar *de novo* la secuencia de *Hsmar2* mediante la técnica de PCR recursiva, utilizando un conjunto de 64 oligonucleótidos (32 pares) de 42 bases cada uno. Dichos oligonucleótidos corresponden a las secuencias SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 65. Las mutaciones introducidas durante el proceso fueron eliminadas por mutagénesis dirigida hasta obtener la secuencia consensus del transposón *Hsmar2*. Posteriormente, la región codificante de la transposasa fue escindida y donada en un cassette de expresión con el promotor CMV (Figura 1a), mientras que las secuencias ITR se donaron en un plásmido diferente flanqueando distintos genes marcadores (β -Gal, GFP, NeoR) (Figura 1b). De esta manera y para permitir el análisis de la actividad de *Hsmar2* separamos en dos plásmidos distintos la transposasa del transposón.

Esta separación nos permite diseñar experimentos para confirmar la actividad de la transposasa *Hsmar2* en células humanas. Así, transducimos células humanas (células HeLa) con un plásmido que contenía las secuencias TR de *Hsmar2* que flanquean un cassette de expresión de la resistencia a la neomicina (plásmido TR-Neo), conjuntamente con un plásmido que contenía la transposasa *Hsmar2* con el promotor CMV (plásmido CMV-*Hsmar2*). Como controles, se utilizaron plásmidos con el cassette de neomicina sin estar flanqueado por secuencias TR (plásmido pCi-Neo), y un plásmido con el gen reportero β Gal bajo la acción del promotor CMV (plásmido pCMV- β Gal). En el caso de ocurra una transposición, esta solo debería pasar cuando ambos elementos (transposasa y secuencias TR) estén presentes en la célula al mismo tiempo. Tal como se puede observar en la Figura 2, el mayor número de colonias resistentes a la neomicina se da en la condición esperada: plásmido CMV-*Hsmar2* + plásmido TR-Neo. Ello indica que la transposasa *Hsmar2* es activa y que media específicamente la integración del cassette de resistencia a la neomicina cuando este está flanqueado por las secuencias ITR.

Además, tal y como se puede observar en la Figura 3, para que la transposición ocurra es imprescindible que la transposasa *Hsmar2* suministrada *in trans* sea una transposasa activa. Para demostrarlo generamos un nuevo plásmido control (plásmido *Hsmar2*-AF) que contenía un transposón completo amplificado a partir del locus AF107258 (21q22.1) con una homología de secuencia del 94% con la *Hsmar2* consensus, pero con múltiples mutaciones inactivantes. Así, únicamente se observa transposición del transposón TR-Neo cuando la transposasa *Hsmar2* activa está presente.

Seguidamente analizamos si la actividad de *Hsmar2* era dependiente de dosis y correlacionaba con la cantidad de transposasa en la célula. Para ello hicimos un experimento similar al anterior, pero ahora variando tanto la cantidad transducida del plásmido TR-Neo como del plásmido CMV-*Hsmar2*. Así, a más cantidad de transposasa (CMV-*Hsmar2*), y a mayor cantidad de transposones (TR-Neo) se detecta un mayor número de clones (Figura 4), lo que quiere decir que no sólo los dos elementos son necesarios, sino que el nivel de transposición depende tanto de la su cantidad absoluta tanto de la transposasa como del transposón, así como de su proporción relativa.

Otro punto importante es determinar cuan específica es la interacción transposasa:transposón, es decir entre interacción entre la transposasa y las secuencias TR. Para ello, se analizó la capacidad de transposición mediada por *Hsmar2*, de un cassette de resistencia a la neomicina que estaba flanqueado bien por secuencias ITR de *Hsmar2* o por secuencias ITR de Sleeping Beauty (otra transposasa mariner) (Figura 5a). Asimismo, se determinó si las secuencias ITR de *Hsmar2* podían ser reconocidas por otras transposasas mariner (Sleeping Beauty) (Figura 5b). Tal como se puede observar, únicamente cuando coincidían la transposasa *Hsmar2* con las ITR de *Hsmar2* se observaba transposición, indicando que la interacción es muy específica y que no hay "promiscuidad" entre diferentes transposasas. Evidentemente, ello tiene importantes consecuencias a nivel de bioseguridad ya que la expresión de la transposasa *Hsmar2* solo permite transponer secuencias de su transposón (flanqueadas por sus ITR), pero no las de otros transposones que puedan estar durmientes o inactivos en el genoma del organismo donde se expresa.

Sin embargo, en experimentos con células humanas HeLa observamos que la sobreexpresión de *Hsmar2* provocaba la muerte celular entre las 24 y las 48 horas posteriores a la transducción. Estos resultados coinciden con lo reportado para otras transposasas mariner. Así, parece que la sobreexpresión y posterior entrada en el núcleo celular induce la generación de cortes o "nicks" en el genoma de la célula huésped. Si el número de cortes es suficientemente elevado la célula entra en apoptosis. Sin embargo, este fenómeno no parece universal porque cuando se repitieron los experimentos en la línea celular humana 293, esta citotoxicidad asociada a la sobreexpresión no era observada. Para determinar las posibles causas de la citotoxicidad se generó una proteína de fusión entre GFP (Green Fluorescent protein) y *Hsmar2* (Figura 6) de manera que mantuviese su actividad, pero nos fuera posible identificar su localización celular. La actividad de este constructo fue confirmada repitiendo los experimentos anteriores. Asimismo, la producción de la proteína quimérica fue confirmada por Western-Blot utilizando un anticuerpo contra GFP. Tal como se puede observar en la Figura 7, la proteína quimérica GFP-*Hsmar2* tiene un mayor tamaño que la proteína GFP de la que deriva.

La transducción de la transposasa quimérica GFP-*Hsmar2* en células HeLa y en células HEK-293 permite observar como en las células HeLa su localización es nuclear, mientras que en las células 293 su localización es mayoritariamente citoplasmática (Figura 8). Es decir, permite correlacionar de manera directa entre citotoxicidad y localización celular: cuando la transposasa se localiza en el núcleo celular (como en las células HeLa) es capaz de generar cortes en el genoma lo que a partir de un cierto nivel inducirá a la célula a entrar en apoptosis. Por el contrario, cuando la

ES 2 300 200 B1

transposasa está localizada en el citoplasma (células HEK-293), donde no es capaz de generar cortes en el genoma y por lo tanto la célula no entrará en apoptosis.

Finalmente, se determinó si el grado de toxicidad estaba asociado a niveles elevados de la transposasa en núcleo o bien tan solo a su presencia en él aunque fuese a niveles bajos. Para ello, se transdujeron células HeLa con distintas cantidades del plásmido GFP-*Hsmar2* y del plásmido control pCMV-GFP, y se analizó el porcentaje de células transducidas vivas en cada condición a lo largo del tiempo mediante FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Como se puede observar en la Figura 9, el porcentaje de células vivas que expresan la proteína GFP cuando son transducidas con el plásmido control pCMV-GFP aumenta con el tiempo, mientras que el porcentaje de células vivas que expresan la proteína GFP cuando son transducidas con el plásmido *pHsmar2*-GFP disminuye con el tiempo, seguramente a una toxicidad mediada por *Hsmar2*.

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere al transposón *Hsmar2*, caracterizado por ser activo en células de mamífero, cuya estructura comprende una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN.

En un aspecto preferido la presente invención se refiere al transposón *Hsmar2* caracterizado por ser activo en células de mamífero, cuya estructura comprende una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, definido por la secuencia SEQ ID NO: 1 al corresponderse, la secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y flanqueada por las dos secuencias ITR, con la secuencia codificante de la enzima transposasa.

Tal y como se utiliza en la invención, el término “transposasa” se refiere a la proteína que realiza la reacción de trasposición de un fragmento de ADN a un genoma receptor.

Por otro lado, el término “transposón” se refiere a un fragmento de ADN formado por la secuencia nucleotídica de un gen (pudiendo ser codificante o no), un promotor que dirige la expresión de dicho gen (en caso de que la secuencia nucleotídica sea codificante), y dos secuencias ITR terminales o flanqueantes de dicha secuencia nucleotídica. Por lo tanto, la secuencia nucleotídica (comprendida entre las secuencias ITR flanqueantes) del transposón puede ser la de cualquier gen susceptible de ser transferida e insertada en el genoma de la célula receptora (en la presente invención es la secuencia del gen de resistencia a Neomicina), suministrándose en este caso la Transposasa en trans mediante un segundo vector (plásmido) bajo la acción de un promotor que sería el encargado de dirigir la expresión del gen de la transposasa. Por lo tanto, en este caso el sistema estaría formado por dos componentes tal y como se detalla en la figura 1.

De forma particular la secuencia nucleotídica (comprendida entre las secuencias ITR flanqueantes) del transposón puede corresponderse con la secuencia codificante de la transposasa, con lo cual no sería necesario que ésta fuera administrada en trans. En este caso el transposón se correspondería con la SEQ ID NO: 1.

Tal y como se utiliza en la presente invención el término “transferencia génica” se refiere a un proceso por el cual las secuencias de material genético (ADN o ARN) se introducen en la célula hospedadora. Dicha introducción está mediada por vectores que protegen el material genético y facilitan su unión y entrada en la célula hospedadora previo transporte al núcleo de la misma. En una realización preferida de la invención la transferencia génica, y por lo tanto la introducción del material genético en la célula hospedadora, se realiza con fines terapéuticos, es decir, se realiza “terapia génica”.

En un segundo aspecto la presente invención se refiere al uso del transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN para la generación de vectores con capacidad de integración en el genoma de una célula hospedadora.

En un aspecto preferido la presente invención se refiere al uso del transposón *Hsmar2*, cuya estructura definida por la SEQ ID NO: 1, para la generación de vectores con capacidad de integración en el genoma de una célula hospedadora.

En otro aspecto preferido la presente invención se refiere al uso del transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN o definida por la SEQ ID NO: 1, para la generación de vectores con capacidad de integración en el genoma de una célula hospedadora, donde el vector con capacidad de integración generado es un Adenovirus.

En otro aspecto preferido la presente invención se refiere al uso de los vectores que comprenden el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia, en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica.

En otro aspecto preferido la presente invención se refiere al uso de los vectores que comprenden el transposón *Hsmar2* cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica.

ES 2 300 200 B1

En otro aspecto preferido la presente invención se refiere al uso de los vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia o definida por la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vivo*” en mamíferos.

5 En otro aspecto preferido la presente invención se refiere al uso de los vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia o definida por la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vivo*” en humanos.

10 En otro aspecto preferido la presente invención se refiere al uso de los vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia o definida por la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vitro*” en cultivos de células de mamíferos.

15 En otro aspecto preferido la presente invención se refiere al uso de los vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia o definida por la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vitro*” en cultivos de células de humanos.

20 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia codificante.

En un aspecto preferido la presente invención se refiere a un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1.

30 En otro aspecto preferido la presente invención se refiere a un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia codificante, o definida por la SEQ ID NO: 1, donde el vector es un Adenovirus.

35 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN.

40 Un aspecto preferido de la presente invención se refiere a células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1.

45 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso de las células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, para la elaboración de composiciones farmacéuticas destinadas a ser utilizadas en transferencia génica.

Un aspecto preferido de la presente invención se refiere al uso de las células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1 para la elaboración de composiciones farmacéuticas destinadas a ser utilizadas en transferencia génica.

50 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

55 Un aspecto preferido de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen células transferidas génicamente por vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN y vehículos farmacéuticamente aceptables.

65 Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen células transferidas génicamente por vectores que comprenden el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

ES 2 300 200 B1

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a un método de transfección celular que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, el cual comprende la transfección adicional de la Transposasa en trans, utilizando un segundo vector.

Un aspecto preferido de la presente invención se refiere a un método de transfección celular que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a método de transfección celular que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, el cual comprende la transfección adicional de la Transposasa en trans utilizando un segundo vector, o que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, donde las células transfectadas son de mamífero.

Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a método de transfección celular que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, el cual comprende la transfección adicional de la Transposasa en trans utilizando un segundo vector, o que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, donde las células transfectadas son humanas.

Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a método de transfección celular que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, el cual comprende la transfección adicional de la Transposasa en trans utilizando un segundo vector, o que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón Hsmar2 cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, donde el vector es un Adenovirus.

La exposición detallada de los ejemplos y de las figuras que siguen, se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen los procedimientos utilizados tanto para la generación de la transposasa *Hsmar2* como analizar su actividad.

Para llevar a cabo estos ensayos, se utilizaron las metodologías que se describen a continuación:

Amplificación y purificación de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico en bajas cantidades (5-15 μg) se realizan minipreparaciones de ADN por lisis alcalina a partir de 3 mL de cultivo. Este método se basa en la lisis de las bacterias a partir de un tampón alcalino, seguido de una precipitación de proteína con acetato potásico y una posterior precipitación del plásmido mediante isopropanol y un lavado final con etanol al 70%. El ARN es eliminado mediante RNAsa A.

- Solución de resuspensión: 50 mM Tris-Cl a pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAsaA.

- Solución de lisis: 200 mM NaOH; 1% SDS (w/v).

- Solución de precipitado proteico: 3,0 M Acetato potásico pH 5,5

Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de ADN en geles de agarosa se realizó mediante el kit GENE CLEAN Turbo Kit de Q-BIOgene (Irvine, California, EE.UU.) siguiendo el protocolo que ofrece el fabricante.

Enzimas de restricción, de ligación y fosfatasa alcalina

Los enzimas utilizados en este trabajo provienen de la marca FERMENTAS y NEW ENGLAND Biolabs. Se han utilizado 5U de digestión para 2 μg de ADN plasmídico en las condiciones de temperatura y solución establecidas por el fabricante. El tiempo de digestión varía de 1-18 horas en función de la dosis administrada. La ligasa y fosfatasa alcalina se han utilizado en las dosis y tiempos establecidos por el fabricante.

ES 2 300 200 B1

Secuenciación de los plásmidos originados

La secuenciación de las secuencias generadas se realizó tanto en el Servicio de Secuenciación de Genethon III (Evry, Francia) como en el Servicio de Secuenciación de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

PCR recursiva

Paso 1°:

| Fragmento amplificado | Oligonucleótidos directos | Oligonucleótidos reversos |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------------|
| (#A) | MC-D (1,2,3,4,5,6,7,8) | MC-R2-(32,31,30,29,28,27,26,25) |
| (#B) | MC-D (8,9,10,11,12,13,14,15) | MC-R2-(25,24,23,22,21, 20,19,18) |
| (#C) | MC-D (14,15,16,17,18,19,20) | MC-R2-(19,18,17,16,15,14,13) |
| (#D) | MC-D (20,21,22,23,24,25,26) | MC-R2-(13,12,11,10,9,8,7) |
| (#E) | MC-D (26,27,28,29,30,31,32) | MC-R2-(7,6,5,4,3,2,1) |

Los oligonucleótidos arriba citados se encuentran representados por las secuencias SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 65.

Con estos oligos se amplificó una banda de 140 bp mediante 30 ciclos de PCR.

1 pmol cada oligonucleótido

5 μ l buffer Taq (sin Mg⁺⁺)

1 μ l MgCl₂ (60 mM)

0,8 μ l dNTPs (1.25 mM)

1 unidad Taq Pol + 0,03 μ l Taq Ultima

agua milliQ hasta 50 μ l

Condiciones: 94°C, 30 sec,

94°C 30 seg,

45°C + 0,4°C/ciclo 30 seg,

72°C 20 sec + 0,5 seg/ciclo

durante 20 ciclos,

72°C, 2 min

25°C, 2 min

ES 2 300 200 B1

Paso 2°:

10 μ l buffer Taq (sin Mg^{++})

5 2 μ l $MgCl_2$ (60 mM)

1,6 μ l dNTPs (1.25 mM)

1 unidad Taq Pol + 0,03 μ l Taq Ultima

10

6 μ l de cada PCR previa (fragmentos A +B para generar nuevo fragmento JP-1

fragmentos C + D + E para generar nuevo fragmento JP-2

15

agua milliQ hasta 100 μ l

Condiciones: 94°C, 30 sec,

20

94°C 30 seg,

50°C + 0,2°C/ciclo 30 seg,

72°C 50 sec

25

durante 15 ciclos,

Añadir 40 pmol de oligos: MC-D-1 + MC-R2-18 para fragmento JP-1

30

MC-D-14 + MC-R2-1 para fragmento JP-2

Hacer 15 ciclos más

72°C, 2 min

35

25°C, 2 min

Paso 3°:

40

- Purificación de los fragmentos de PCR

- Clonación en plásmido p123T

- Secuenciación de al menos 20 clones diferentes de cada construcción p123T/PJ-1 o p123T/PJ-2

45

- Para cada construcción, se seleccionó el clon con menos mutaciones con respecto a la secuencia esperada.

- Eliminación de las mutaciones no deseadas mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)

50

- Combinación de ambos fragmentos mediante la utilización de la diana interna PstI que es única en ambos constructos (posición 573 de JP) para generar el transposón completo *Hsmar2*.

- Secuenciación final para confirmar la ausencia de mutaciones en la construcción generada.

55

Clonación de transposón Hsmar2-AF

Mediante PCR se amplificó el transposón *Hsmar2* inactivo presente en el locus AF1072585 localizado en el 21q22.1. Las condiciones de amplificación fueron:

60

100 ng de ADN humano (extraído de células HeLa)

40 pmol cada oligonucleótido

65

10 μ l buffer Taq (sin Mg^{++})

5 μ l $MgCl_2$ (60 mM)

ES 2 300 200 B1

1,6 μ l dNTPs (1.25 mM)

2 unidades Taq Pol + 0,03 μ l Taq Ultima

5 agua milliQ hasta 100 μ l

Condiciones: 94°C, 30 sec,

10 94°C 30 seg,

48°C 30 seg,

74°C 30 sec

15 durante 35 ciclos,

72°C, 2 min

20 25°C, 2 min

El fragmento de PCR fue donado en el plásmido pCR-TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente plásmidos con patrón de restricción positivo fueron secuenciados para confirmar la secuencia del transposón *Hsmar2* del locus AF107258.

25 *Experimentos in vitro*

Las células (HeLa o HEK-293) se cultivaron en placas de 6 pocillos en medio de cultivo DMEM + 10% FBS. Cuando están a un 80% de confluencia (alrededor de 800.000 células por pocillo) están listas para transfectar. La transfección se hace utilizando PEI (Sigma) a una proporción de 2.25 111 (10 mM) por cada microgramo de ADN, utilizando como norma, 6 μ g de ADN por pocillo. Se dejan formar los complejos durante 30 minutos y luego se añaden a las células durante 4 horas. Después de este tiempo se cambia el medio de las células por medio fresco con DMEM y 10% FBS y se incuban a 37°C y 5% CO₂ hasta su análisis.

35 *Generación de clones resistentes a la Neomicina*

Las células se tripsinizan 48 horas después de la transfección y se cultivan en placas de 10-cm en presencia de medio DMEM con 10% FBS y neomicina (600 μ g/ml). Cada dos días se añade medio fresco DMEM con 10% FBS y neomicina (600 μ g/ml), hasta que los clones individuales son claramente visibles.

40 *Análisis por FACS*

Para el análisis por FACS se recogieron muestras a las 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS al 1% y se fijaron en paraformaldehído al 2%. Una vez fijadas las células, se analizaron y cuantificaron en el servicio de FACS del instituto del IBB-UAB.

45 **Bibliografía**

1. **Lampe, D. J., et al.** A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition *in vitro*. *Embo J* 15, 5470-9. (1996).

2. **Robertson, H. M. et al.** Molecular evolution of an ancient mariner transposon, Hsmar1, in the human genome. *Gene* 205, 203-17. (1997).

3. **Oosumi, T., Belknap, W. R. & Garlick, B.** Mariner transposons in humans. *Nature* 378, 672. (1995).

4. **Robertson, H. M. & Martos, R.** Molecular evolution of the second ancient human mariner transposon, Hsmar2, illustrates patterns of neutral evolution in the human genome lineage. *Gene* 205, 219-28. (1997).

5. **Reiter, L. T., Liehr, T., Rautenstrauss, B., Robertson, H. M. & Lupski, J. R.** Localization of mariner DNA transposons in the human genome by PRINS. *Genome Res* 9, 839-43. (1999).

6. **Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. & Izsvak, Z.** Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91, 501-10. (1997)

65 7. **Hartl, D. L., Lohe, A. R. & Lozovskaya, E. R.** Modern thoughts on an ancient mariner: function, evolution, regulation. *Annu Rev Genet* 31, 337-58 (1997).

ES 2 300 200 B1

8. **Yang, Y., Greenough, K. & Wilson, J. M.** Transient immune blockade prevents formation of neutralizing antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver. *Gene Ther* 3, 412-20. (1996).

5 9. **Zhang, L, Sankar, U, Lampe, D. J., Robertson, H. M. & Graham, F. L.** The Himar1 mariner transposase cloned in a recombinant adenovirus vector is functional in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 26, 3687-93. (1998).

10. **Yant, S. R. et al.** Transposition from a gutless adeno-transposon vector stabilizes transgene expression *in vivo*. *Nat Biotechnol* 20, 999-1005. (2002)

10 11. **Yant, S. R. et al.** Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet* 25, 35-41. (2000).

12. **Ortiz-Urda S. et al** Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med* 8, 1166-70 (2002).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 200 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Transposón *Hsmar2*, **caracterizado** por ser activo en células de mamífero, cuya estructura comprende una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN.
- 10 2. Transposón *Hsmar2*, según la reivindicación 1, definido por la secuencia SEQ ID NO: 1 al corresponderse, la secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y flanqueada por las dos secuencias ITR, con la secuencia codificante de la enzima transposasa.
- 15 3. Uso del transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN para la generación de vectores con capacidad de integración en el genoma de una célula hospedadora.
- 20 4. Uso del transposón *Hsmar2*, según la reivindicación 3, cuya estructura definida por la SEQ ID NO: 1, para la generación de vectores con capacidad de integración en el genoma de una célula hospedadora.
- 25 5. Uso de los vectores que comprenden el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica.
- 30 6. Uso de los vectores que comprenden el transposón *Hsmar2*, según la reivindicación 5, cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, en la elaboración de composiciones destinadas a la realización de transferencia génica.
- 35 7. Uso, según la reivindicaciones 5 o 6, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vivo*” en mamíferos.
- 40 8. Uso, según la reivindicación 7, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vivo*” en humanos.
- 45 9. Uso, según la reivindicación 5 o 6, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vitro*” en cultivos de células de mamíferos.
- 50 10. Uso, según la reivindicación 9, donde dicha transferencia génica se realiza “*in vitro*” en cultivos de células de humanos.
- 55 11. Uso, según la reivindicación 3 o 4, donde el vector con capacidad de integración generado es un Adenovirus.
- 60 12. Vector que comprende el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia codificante.
- 65 13. Vector que comprende el transposón *Hsmar2*, según la reivindicación 12, cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1
- 70 14. Vector, según la reivindicaciones 12 o 13, **caracterizado** por ser un Adenovirus.
- 75 15. Células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN.
- 80 16. Células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón *Hsmar2*, según la reivindicación 15, cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1.
- 85 17. Uso de las células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, para la elaboración de composiciones farmacéuticas destinadas a ser utilizadas en transferencia génica.
- 90 18. Uso de las células transferidas génicamente por un vector que comprende el transposón *Hsmar2*, según la reivindicación 17, cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, para la elaboración de composiciones farmacéuticas destinadas a ser utilizadas en transferencia génica.
- 95 19. Composiciones farmacéuticas que contienen vectores que comprenden el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, y vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 100 20. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 19, que contienen vectores que comprenden el transposón *Hsmar2* cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

ES 2 300 200 B1

21. Composiciones farmacéuticas que contienen células transferidas génicamente por vectores que comprenden el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferida génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN y vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 22. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 21, que contienen células transferidas génicamente por vectores que comprenden el transposón *Hsmar2* cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 23. Método de transfección celular que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón *Hsmar2* cuya estructura está comprendida por una secuencia de ADN susceptible de ser transferido génicamente y dos secuencias ITR flanqueantes de dicha secuencia de ADN, el cual comprende la transfección adicional de la Transposasa en trans utilizando un segundo vector.

15 24. Método de transfección celular que consiste en la introducción en una célula hospedadora de un vector que comprende el transposón *Hsmar2* cuya estructura está definida por la SEQ ID NO: 1.

25 25. Método de transfección celular, según las reivindicaciones 23 o 24, donde las células transfectadas son de mamífero.

20 26. Método de transfección celular, según las reivindicaciones 23-25, donde las células transfectadas son humanas.

27. Método de transfección celular, según las reivindicaciones 23-26, donde el vector es un Adenovirus.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

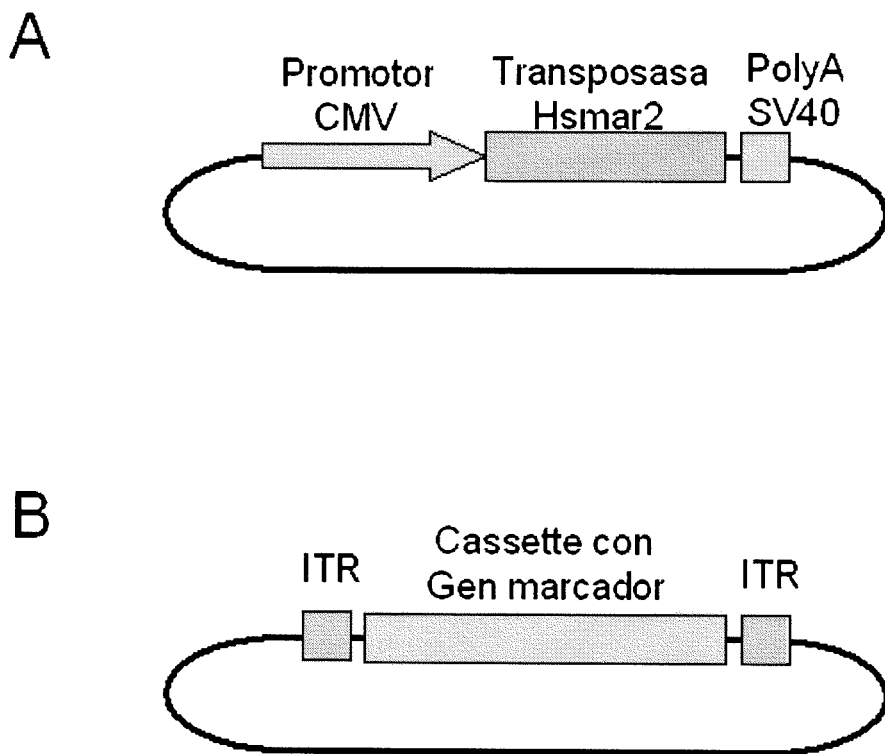


Figura 2

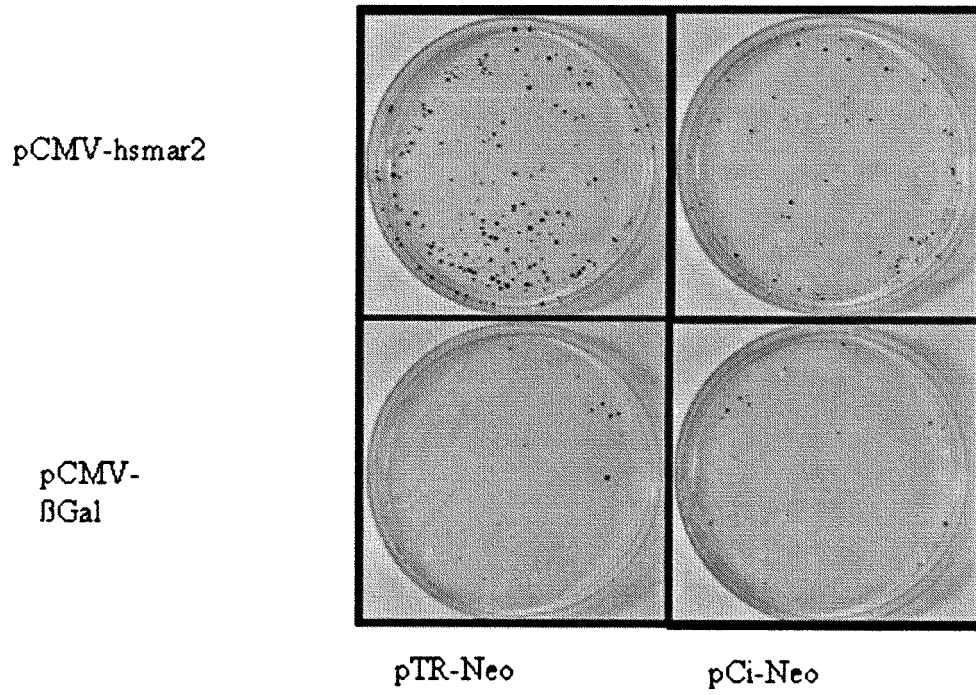


Figura 3

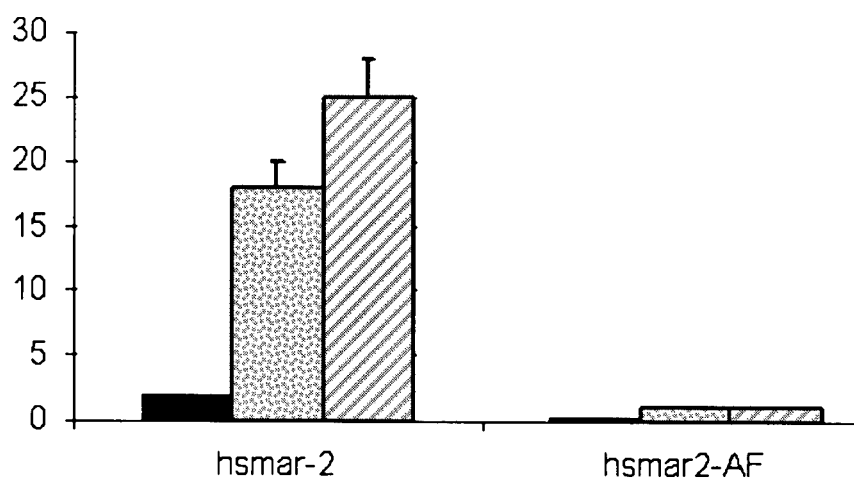


Figura 4

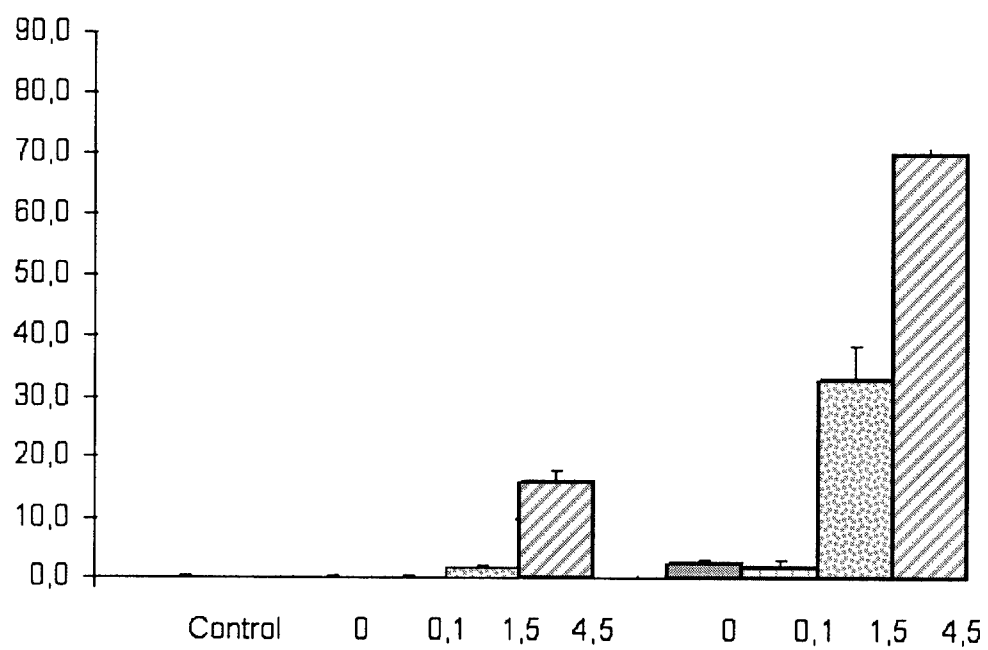


Figura 5

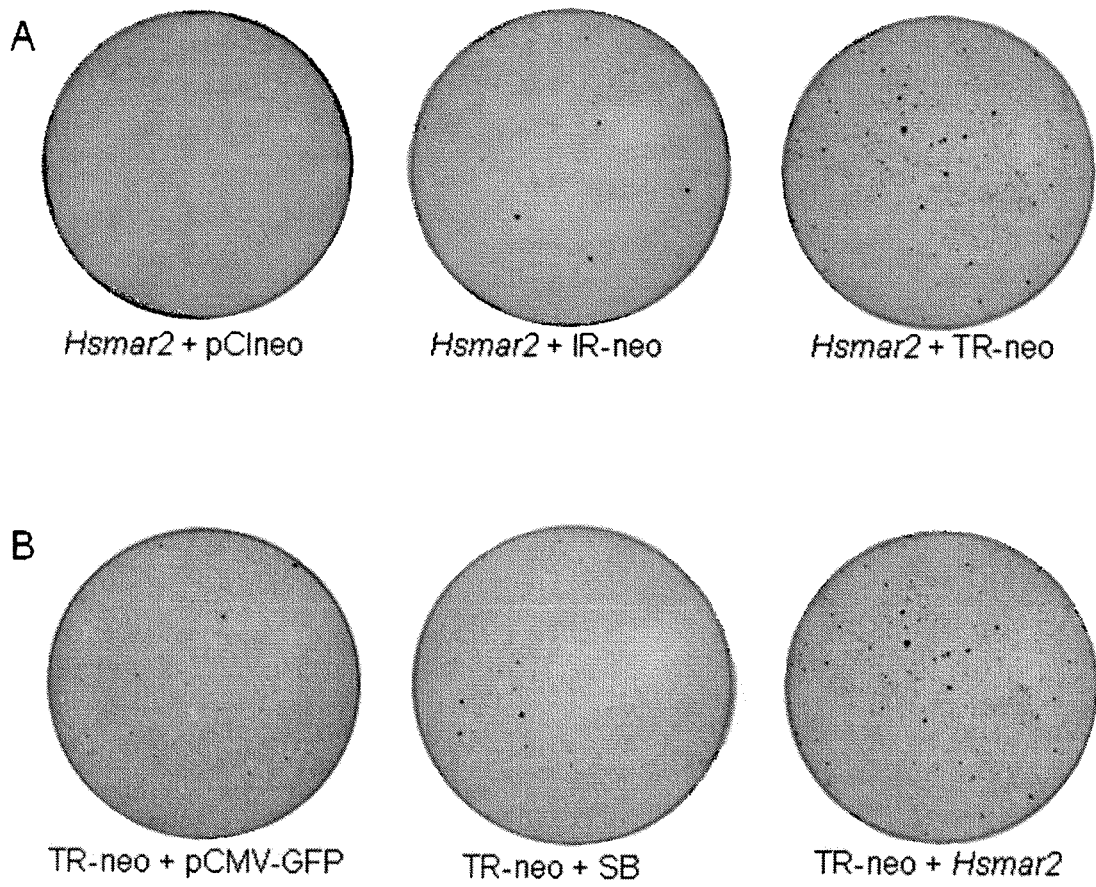


Figura 6

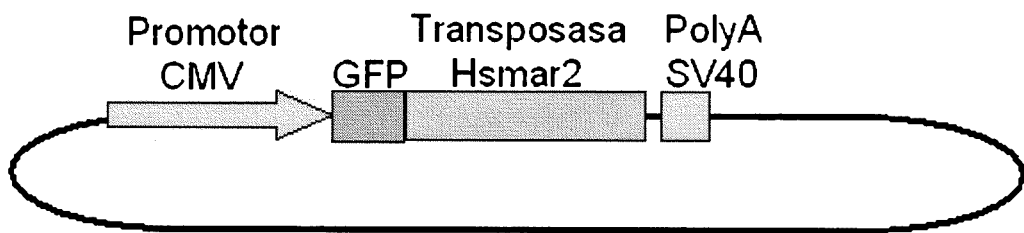


Figura 7

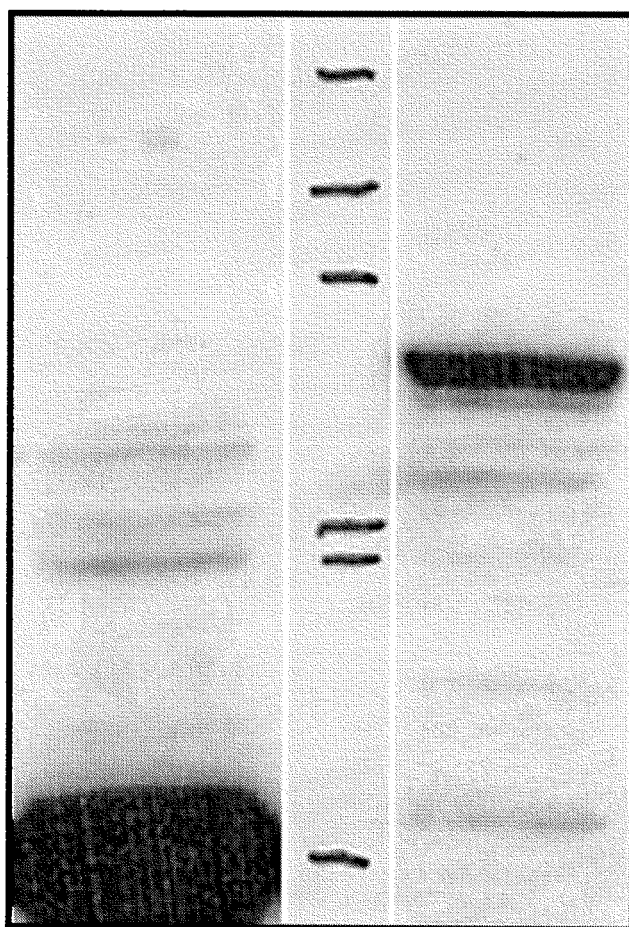


Figura 8

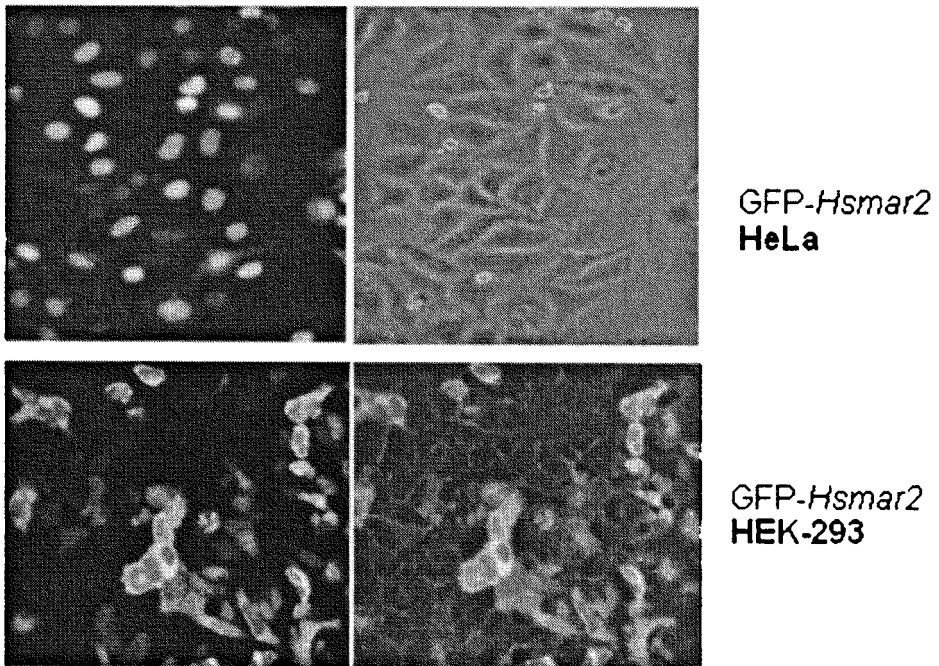
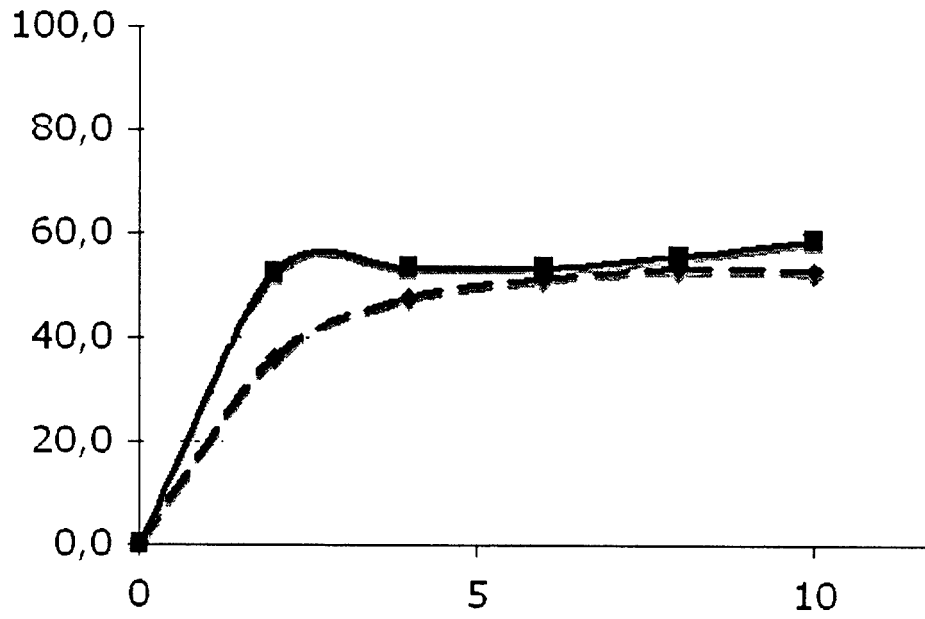
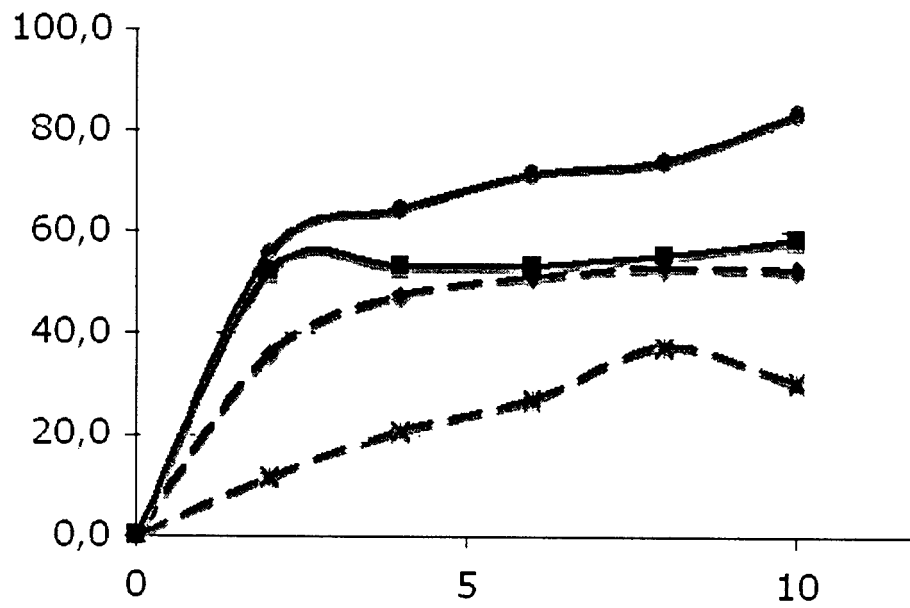


Figura 9

A)



B)



ES 2 300 200 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> - UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
- Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats

5 <120> Transposón Hsmar2 y su uso en la generación de vectores útiles en terapia génica somática.

<130> 1302006MC

<160> 66.

10 <210> SEQ ID NO: 1

<211> 1301.

<212> ADN.

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Transposón Hsmar2.

20 <400> 1

| | | |
|----|--|------|
| | cgaggggtct tcaaaaagtt catggaaaat gcgtattatg aaaaaactat gcatggatt | 60 |
| | caaaatttt tgcaccaaaa taaactcgta ctaacttgtt ataacatgtc tgaacaggat | 120 |
| 25 | ctagtttgag gcactaagaa ggataagaca tcagtttgaa aagagcccct atcagagcaa | 180 |
| | catgaattct gctaaaattg aagcaagaac aaacatcaaa tttatggtga agcttgggtg | 240 |
| 30 | gaagaatggt gaaatcattg atgctttacg aaaagttat ggggacaatg ccccaaagaa | 300 |
| | atcagcagtt tacaatgga taactcgttt taagaaggga cgagatgatg ttgaagatga | 360 |
| 35 | agccccgagc ggcagacat ccacatcaat ttgtgaggaa aaaattaatc ttgttcgtgc | 420 |
| | cctaattgaa gaggaccgac gattaacagc agaacaata gccaacacca cagacatctc | 480 |
| | aattggttca gcttacacia ttctgactga aaaattaaag ttgagcaaac ttccactcg | 540 |
| 40 | atgggtgcca aaaccattgc gccagatca gctgcagaca agagcagagc ttcaatgga | 600 |
| | aattttaaac aagtgggatc aagatcctga agcatttctt cgaagaattg taacaggaga | 660 |
| 45 | tgaaacatgg ctttaccagt acgatcctga agacaaagca caatcaaagc aatggctacc | 720 |
| | aagaggtgga agtgggtccag tcaaagcaaa agcggaccgg tcaagagcaa aggtcatggc | 780 |
| | aacagtttt tgggatgctc aaggcatttt gcttgttgac ttctggagg gccaaagaac | 840 |
| 50 | gataacatct gcttattatg agagtgttt gagaaagtta gccaaagcct tagcagaaaa | 900 |
| | acgcccggga aagcttcacc agagagtctt tctccaccac gacaatgctc ctgctcattc | 960 |
| 55 | ctctcatcaa acaagggcaa ttttgcgaga gtttcgatgg gaaatcatta gcatccacc | 1020 |
| | ttacagtctt gatttgctc cttctgactt cttttgttt cctaacttta aaaaatctt | 1080 |
| | aaagggcacc ctttttctt cagtaataa tgtaaaaaag actgcattga catggttaaa | 1140 |
| 60 | ttcccaggac cctcagtctt ttagggatgg actaaatggc tggtatcacc gcttacaaaa | 1200 |
| | gtgtcttgaa ctgatggag cttatgttga gaaataaagt ttatatttt aattttatc | 1260 |
| 65 | ttttaattcc attttccat gaacttttg aagtcacctc g | 1301 |

ES 2 300 200 B1

<210> SEQ ID NO: 2
<211> 42.
<212> ADN.
5 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-1.

10 <400> 2

actgactggt cagtcaactg actggatcca ttcagctagc tg 42

15 <210> SEQ ID NO: 3
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
20 <220>
<223> Oligonucleótido MC-D-2.

25 <400> 3

cgaggggtct tcaaaaagt catggaaaat gcgtattatg aa 42

30 <210> SEQ ID NO: 4
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
35 <220>
<223> Oligonucleótido MC-D-3.

40 <400> 4

aaaactatgc atggattca aaatttttg caccaaata aa 42

45 <210> SEQ ID NO: 5
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
<220>
50 <223> Oligonucleótido MC-D-4.

<400> 5

55 ctcgtactaa cttgtataa catgtctgaa caggatctag tt 42

<210> SEQ ID NO: 6
<211> 42.
60 <212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
<220>
65 <223> Oligonucleótido MC-D-5.

ES 2 300 200 B1

<400> 6

tgaggcacta agaaggataa gacatcagtt tgaagagagc cc

42

5

<210> SEQ ID NO: 7

<211> 42.

<212> ADN.

10 <213> Secuencia artificial.

<220>

<223> Oligonucleótido MC-D-6.

15 <400> 7

ctatcagagc aacatgaatt ctgctaaaat tgaagcaaga ac

42

20 <210> SEQ ID NO: 8

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

25

<220>

<223> Oligonucleótido MC-D-7.

30 <400> 8

aaacatcaaa ttatgggtga agcttgggtg gaagaatggt ga

42

35 <210> SEQ ID NO: 9

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

40

<220>

<223> Oligonucleótido MC-D-8.

<400> 9

45

aatcattgat gctttacgaa aagtttatgg ggacaatgcc cc

42

<210> SEQ ID NO: 10

50

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

<220>

55

<223> Oligonucleótido MC-D-9.

<400> 10

60

aaagaaatca gcagtttaca aatggataac tcgtttaag aa

42

<210> SEQ ID NO: 11

65

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

ES 2 300 200 B1

<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-10.

5 <400> 11
gggacgagac gatgttgaag atgaagcccg cagcggcaga cc 42

10 <210> SEQ ID NO: 12
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

15 <220>
<223> Oligonucleótido MC-D-11.

<400> 12

20 atccacatca attgtgagg aaaaaattaa tctgttcgt gc 42

<210> SEQ ID NO: 13
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

25 <220>
<223> Oligonucleótido MC-D-12.

<400> 13

30 cctaattgaa gaggaccgac gattaacagc agaacaata gc 42

<210> SEQ ID NO: 14
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

35 <220>
<223> Oligonucleótido MC-D-13.

<400> 14

40 caacaccaca gacatctcaa ttggttcagc ttacacaatt ct 42

<210> SEQ ID NO: 15
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

45 <220>
<223> Oligonucleótido MC-D-14.

<400> 15

50 gactgaaaaa ttaaagtga gcaaacttcc cactcgatgg gt 42

65 <210> SEQ ID NO: 16
<211> 42.

ES 2 300 200 B1

<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
<220>
5 <223> Oligonucleótido MC-D-15.

<400> 16

10 gccaaaaccg ttgcgccag atcagctgca gacaagagca ga 42

<210> SEQ ID NO: 17
<211> 42.
15 <212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
<220>
20 <223> Oligonucleótido MC-D-16.

<400> 17

25 gctttcaatg gaaatttaa acaagtggga tcaagatcct ga 42

<210> SEQ ID NO: 18
<211> 42.
30 <212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
<220>
35 <223> Oligonucleótido MC-D-17.

<400> 18

40 agcatttctt cgaagaattg taacaggaga tgaacatgg ct 42

<210> SEQ ID NO: 19
<211> 42.
<212> ADN.
45 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-18.

50 <400> 19

ttaccgtac gatcctgaag acaaagcaca atcaaagcaa tg 42

55 <210> SEQ ID NO: 20
<211> 42.
<212> ADN.
60 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-19.

65 <400> 20

gctaccaaga ggtggaagtg gtccagtcaa agcaaaagcg ga 42

ES 2 300 200 B1

- <210> SEQ ID NO: 21
<211> 42.
<212> ADN.
5 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-20.
- 10 <400> 21

ctgtcaaga gcaaaggtca tggcaacagt ttttgggat gc 42
- 15 <210> SEQ ID NO: 22
<211> 42.
<212> ADN.
20 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-21.
- 25 <400> 22

tcaaggcatt ttgctgttg actttctgga gggccaaaga ac 42
- 30 <210> SEQ ID NO: 23
<211> 42.
<212> ADN.
35 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-22.
- 40 <400> 23

gataacatct gcttattatg agagtgttt gagaaagta gc 42
- 45 <210> SEQ ID NO: 24
<211> 42.
<212> ADN.
50 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-23.
- 55 <400> 24

caaagcttta gcagaaaaac gcccgggaaa gcttcaccag ag 42
- 60 <210> SEQ ID NO: 25
<211> 42.
<212> ADN.
65 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-D-24.

ES 2 300 200 B1

<400> 25

agtccttctc caccacgaca atgctcctgc tcattcctct ca

42

5

<210> SEQ ID NO: 26

<211> 42.

<212> ADN.

10 <213> Secuencia artificial.

<220>

<223> Oligonucleótido MC-D-25.

15 <400> 26

tcaacaagg gcaatttgc gagagtttcg atgggaaatc at

42

20 <210> SEQ ID NO: 27

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

25

<220>

<223> Oligonucleótido MC-D-26.

30 <400> 27

taggcatcca ccttacagtc ctgattggc tccttctgac tt

42

<210> SEQ ID NO: 28

35

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

40

<220>

<223> Oligonucleótido MC-D-27.

<400> 28

45

ctttttgtt cctaactta aaaaatctt aaagggcacc ca

42

<210> SEQ ID NO: 29

50

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

<220>

55

<223> Oligonucleótido MC-D-28.

<400> 29

60

ttttcttca gttaataatg taaaaaagac tgcattgaca tg

42

<210> SEQ ID NO: 30

65

<211> 42.

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial.

ES 2 300 200 B1

| | | |
|----|---|----|
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-D-29. | |
| 5 | <400> 30 | |
| | gttaaattcc caggaccctc agttctttag g gatggacta aa | 42 |
| 10 | <210> SEQ ID NO: 31 | |
| | <211> 42. | |
| | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| 15 | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-D-30. | |
| | <400> 31 | |
| 20 | tgctggtat catcgcttac aaaagtgct tgaactgat gg | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 32 | |
| 25 | <211> 42. | |
| | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| 30 | <223> Oligonucleótido MC-D-31. | |
| | <400> 32 | |
| 35 | agcttatggt gagaataaaa gtttatatt ttaatttta tc | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 33 | |
| 40 | <211> 42. | |
| | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| 45 | <223> Oligonucleótido MC-D-32. | |
| | <400> 33 | |
| 50 | tttaattcc attttccat gaacttttg aagtcacctc g | 41 |
| | <210> SEQ ID NO: 34 | |
| | <211> 42. | |
| 55 | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| 60 | <223> Oligonucleótido MC-R2-1. | |
| | <400> 34 | |
| | cacctgaaa aggatccgct agccgagggg acttcaaaaa gt | 42 |
| 65 | <210> SEQ ID NO: 35 | |
| | <211> 42. | |

ES 2 300 200 B1

| | | |
|----|---|----|
| | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| 5 | <223> Oligonucleótido MC-R2-2. | |
| | <400> 35 | |
| 10 | tcattgaaaa atggaattaa aagataaaaa ttaaaaatat aa | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 36 | |
| | <211> 42. | |
| 15 | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| 20 | <223> Oligonucleótido MC-R2-3. | |
| | <400> 36 | |
| 25 | actttatttc tcaacataag ctccatcaag ttcaagacac tt | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 37 | |
| | <211> 42. | |
| 30 | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-R2-4. | |
| 35 | <400> 37 | |
| 40 | ttgtaagcga tgataaccagc catttagtcc atccctaaag aa | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 38 | |
| | <211> 42. | |
| | <212> ADN. | |
| 45 | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-R2-5. | |
| 50 | <400> 38 | |
| | ctgagggtcc tgggaattta accatgtcaa tgcagtcttt tt | 42 |
| 55 | <210> SEQ ID NO: 39 | |
| | <211> 42. | |
| | <212> ADN. | |
| 60 | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-R2-6. | |
| 65 | <400> 39 | |
| | tacattatta actgaagaaa aatgggtgcc cttaaagat tt | 42 |

ES 2 300 200 B1

- <210> SEQ ID NO: 40
<211> 42.
<212> ADN.
5 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-7.
- 10 <400> 40

ttaaagatta ggaacaacaaa agaagtcaga aggagccaaa tc 42
- 15 <210> SEQ ID NO: 41
<211> 42.
<212> ADN.
20 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-8.
- 25 <400> 41

aggactgtaa ggtggatgcc taatgatttc ccatcgaac tc 42
- 30 <210> SEQ ID NO: 42
<211> 42.
<212> ADN.
35 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-9.
- 40 <400> 42

tcgcaaaatt gcccttggtt gatgagagga atgagcagga gc 42
- 45 <210> SEQ ID NO: 43
<211> 42.
<212> ADN.
50 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-10.
- 55 <400> 43

attgtcgtgg tggagaagga ctctctggtg aagctttccc gg 42
- 60 <210> SEQ ID NO: 44
<211> 42.
<212> ADN.
65 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-11.

ES 2 300 200 B1

<400> 44
cggttttct gctaaagctt tggctaactt tctcaaaaca ct 42

5 <210> SEQ ID NO: 45
<211> 42.
<212> ADN.
10 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-12.

15 <400> 45
ctcataataa gcagatgta tcgttcttg gccctccaga aa 42

20 <210> SEQ ID NO: 46
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
25 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-13.

30 <400> 46
gtcaacaagc aaaatgcctt gagcatccca aaaaactgtt gc 42

35 <210> SEQ ID NO: 47
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
40 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-14.

45 <400> 47
catgacctt gctcttgacc agtccgctt tgcttgact gg 42

50 <210> SEQ ID NO: 48
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
<220>
55 <223> Oligonucleótido MC-R2-15.

60 <400> 48
accactcca cctcttgta gccattgctt tgattgtct tt 42

65 <210> SEQ ID NO: 49
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

ES 2 300 200 B1

<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-16.

5 <400> 49
gtcttcagga tcgtactggt aaagccatgt ttcattctct gt 42

10 <210> SEQ ID NO: 50
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

15 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-17.

<400> 50

20 tacaattctt cgaagaatg cttcaggatc ttgatccac tt 42

<210> SEQ ID NO: 51
25 <211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

30 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-18.

<400> 51

35 gtttaaaatt tccattgaaa gctctgctct tgtctgcagc tg 42

<210> SEQ ID NO: 52
40 <211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

45 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-19.

<400> 52

50 atctgggcgc aacggtttg gcacccatcg agtggaaagt tt 42

<210> SEQ ID NO: 53
55 <211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.

60 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-20.

<400> 53

65 gctcaacttt aattttcag tcagaattgt gtaagctgaa cc 42

<210> SEQ ID NO: 54
<211> 42.

ES 2 300 200 B1

| | | |
|----|--|----|
| | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| 5 | <223> Oligonucleótido MC-R2-21. | |
| | <400> 54 | |
| 10 | aattgagatg tctgtggtgt tggctattgt ttctgctgtt aa | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 55 | |
| | <211> 42. | |
| 15 | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| 20 | <223> Oligonucleótido MC-R2-22. | |
| | <400> 55 | |
| 25 | tcgtcgtcc tcttcaatta gggcacgaac aagattaatt tt | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 56 | |
| | <211> 42. | |
| 30 | <212> ADN. | |
| | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-R2-23. | |
| 35 | <400> 56 | |
| 40 | ttctcacia attgatgtgg atggtctgcc gctgcgggct tc | 42 |
| | <210> SEQ ID NO: 57 | |
| | <211> 42. | |
| | <212> ADN. | |
| 45 | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-R2-24. | |
| 50 | <400> 57 | |
| | atcttcaaca tcgtctcgtc ccttctaaa acgagttatc ca | 42 |
| 55 | <210> SEQ ID NO: 58 | |
| | <211> 42. | |
| | <212> ADN. | |
| 60 | <213> Secuencia artificial. | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido MC-R2-25. | |
| 65 | <400> 58 | |
| | ttgtaaaact gctgatttct ttggggcatt gtcccataa ac | 42 |

ES 2 300 200 B1

<210> SEQ ID NO: 59
<211> 42.
<212> ADN.
5 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-26.

10 <400> 59
tttcgtaaa gcatcaatga ttcaccatt ctccacca ag 42

15 <210> SEQ ID NO: 60
<211> 42.
<212> ADN.
20 <213> Secuencia artificial.
<220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-27.

25 <400> 60
cttcaccata aattgatgt ttgtcttgc tcaattta gc 42

30 <210> SEQ ID NO: 61
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
35 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-28.

40 <400> 61
agaattcatg ttgctctgat aggggctctt tcaactga tg 42

45 <210> SEQ ID NO: 62
<211> 42.
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
50 <220>
<223> Oligonucleótido MC-R2-29.

<400> 62

55 tttatcctt cttagtgcct caaactagat cctgttcaga ca 42

<210> SEQ ID NO: 63
<211> 42.
60 <212> ADN.
<213> Secuencia artificial.
<220>
65 <223> Oligonucleótido MC-R2-30.

ES 2 300 200 B1

<400> 63

tggtataaca agttagtacg agtttatttt ggtgcaaaaa at

42

5

<210> SEQ ID NO: 64

<211> 42.

<212> ADN.

10 <213> Secuencia artificial.

<220>

<223> Oligonucleótido MC-R2-31.

15 <400> 64

tttgaaatcc atgcatagtt tttcataat acgcatttcc ca

42

20 <210> SEQ ID NO: 65

<211> 42.

<212> ADN.

25 <213> Secuencia artificial.

<220>

<223> Oligonucleótido MC-R2-32.

30 <400> 65

tgaacttttt gaagaccct cgcagctagc tgaatggatc ca

42

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 300 200

② Nº de solicitud: 200602688

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.10.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | ROBERTSON HM & MARTOS R. Molecular evolution of the second ancient human mariner transposon, Hsmar2, illustrates patterns of neutral evolution in the human genome lineage. Gene. 1997, Vol 205 (1-2), páginas 219-228, página 221, párrafo 3.3; página 226, columnas 1-2; página 227, columna 1. | 1-2 |
| X | WO 2006108525 A1 (MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN) 19.10.2006, página 6, líneas 23-25; página 10, líneas 25-33; página 11, líneas 7-26; página 12, líneas 1-18; página 13, líneas 10-33; página 14, líneas 1-26; página 15, líneas 8-33; página 16, líneas 1-4; página 17, líneas 12-24; página 27, líneas 1-22; página 20, líneas 6-26; página 20, líneas 28-33. | 1-27 |
| A | ES 2058738 T3 (DEGUSSA AKTIENGESELLSCHAFT) 11.09.1991, columna 1, líneas 58-68; columna 2, líneas 1-17,32-50; columna 3, líneas 40-48; columna 4, líneas 22-43. | 1-27 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

14.04.2008

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)