

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 709**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/90** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2016 PCT/EP2016/071853**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016 E 16778999 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3350335**

54 Título: **Sistema mejorado de transposón para la administración de genes**

30 Prioridad:

**16.09.2015 EP 15185515**

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

**08.07.2020**

73 Titular/es:

**T-CURX GMBH (100.0%)  
Friedrich-Bergius-Ring 15  
97076 Würzburg, DE**

72 Inventor/es:

**ANEJA, MANISH;  
GEIGER, JOHANNES;  
RUDOLPH, CARSTEN;  
IVICS, ZOLTAN y  
HOLSTEIN, MARTA**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

ES 2 772 709 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Sistema mejorado de transposón para la administración de genes

5 La presente invención se relaciona con un sistema de transposón que comprende (a) una unidad de transposón que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) o repeticiones terminales directas (DTR) que flanquean una secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana; y (b) un ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma; en donde dicho ARN que codifica para dicha transposasa se caracteriza porque contiene una combinación de  
 10 nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados. Más aún, la presente invención se relaciona con el uso de dicho sistema de transposón para la administración de genes *ex vivo* a una célula diana. Además, la presente invención se relaciona con un método *ex vivo* para la administración de genes a una célula diana que comprende los siguientes pasos: (a) poner en contacto el sistema de transposón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una célula; (b) cultivar dicha célula en condiciones permisivas para el cultivo de dicha célula. La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica, así como también con un kit que comprende dicho sistema transposón.

20 La terapia génica basada en células madre hematopoyéticas (HSC) tiene como objetivo la corrección genética de por vida y la reconstrucción hematopoyética, y se ha aplicado en forma exitosa en escenarios clínicos para tratar a una variedad de enfermedades monogénicas incluyendo inmunodeficiencias primarias (Mukherjee y Thrasher, 2013; Touzot y col., 2014). Junto con los beneficios terapéuticos indiscutibles otorgados por el trasplante de HSC autólogas genéticamente corregidas, también se han observado eventos adversos (desarrollo de leucemia) en varios pacientes (Hacein-Bey-Abina y col., 2003; Ott y col., 2006, Hacein- Bey-Abina y col., 2008; Howe y col., 2008). Los eventos adversos resultaron ser producidos por la mutagénesis por inserción de oncogenes causada por los  
 25 vectores gamma retrovirales usados en el ensayo. Este fenómeno típicamente se denomina genotoxicidad, lo cual en general deriva de i) el perfil de integración genómica sesgado de los vectores derivados de MLV que favorece la integración en sitios de inicio de la transcripción (TSS) y ii) la presencia de potentes secuencias de regulación de la transcripción en las repeticiones terminales largas (LTR) del vector retroviral que podrían transactivar transcripcionalmente a los genes cercanos al sitio de integración. Este potencial genotóxico ha planteado serias preocupaciones de seguridad detrás del uso de los vectores virales. Como consecuencia, se ha dedicado un trabajo sustancial al desarrollo de otros vectores que resulten en vectores virales auto inactivantes (SIN) desprovistos de secuencias potenciadoras/promotoras en sus LTR (Bai y col., 2003; Thornhill y col., 2008). Por otro lado, se ha desarrollado el sistema de transposón *Sleeping Beauty* (SB) como plataforma no viral de administración de genes con un perfil de integración casi al azar (Vigdal y col., 2002; Huang y col., 2010) y actividades transcripcionales asociadas al vector despreciables (Walisko y col., 2008) como alternativa potencialmente más segura a los vectores virales comúnmente usados en ensayos de terapia génica.

40 La tecnología de administración de genes por SB típicamente se provee en la forma de dos vectores plasmídicos basados en ADN: uno que porta una unidad de transposón definida por repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean un gen de interés a insertar en el genoma, y otro que codifica para la transposasa SB, el componente enzimático del sistema. Ante su expresión, la transposasa SB inicia el proceso de transposición mediante el reconocimiento y la unión de las ITR. En el siguiente paso, la unidad de transposón es cortada desde la construcción donante e integrada en el locus genómico, conduciendo de esa manera a la expresión estable de un gen de interés en las células genéticamente modificadas y en su progenie. El plásmido colaborador que expresa la transposasa SB se puede reemplazar por el ARNm que codifica para la transposasa, el cual se demostró que confiere una transposición eficaz en líneas celulares de mamífero *in vitro* y en hígado de ratón *in vivo* (Wilber y col., 2006). El fundamento de proveer la función transposasa en la forma de ARNm es el de proveer un ADN con toxicidad celular reducida (Wiehe y col., 2007) y una mayor seguridad mediante la eliminación del riesgo de una inserción involuntaria de la secuencia que codifica para la transposasa en el genoma de las células transfectadas, lo que podría conducir a rondas incontroladas de transposiciones.

55 La generación de una variante hiperactiva superior de la transposasa SB llamada SB100X (Mates y col., 2009) mediante evolución molecular ha abierto nuevas posibilidades para las aplicaciones de terapia génica. De hecho, el sistema de transposón SB se ha adaptado en forma exitosa para proveer una transferencia eficaz estable y una expresión sostenida de transgenes terapéuticos en una variedad de modelos animales de enfermedad (revisado en (Swierczek y col., 2012)), y recientemente ha ingresado en la clínica en el contexto de la terapia génica para cáncer para redireccionar respuestas inmunológicas mediadas por células T contra enfermedades malignas de células B (Williams, 2008). La administración estable de un receptor quimérico de antígeno (CAR) contra CD19 a células T mediante esta nueva estrategia no viral se ha evaluado en ensayos recientes en humanos como eficaz y segura, y la elaboración del producto de grado clínico contra células tumorales se ha evaluado como conveniente desde el punto de vista de los costos, y menos laborioso que lo conseguido mediante la transducción de retrovirus recombinantes (Singh y col., 2013; Singh y col., 2014).

65 Sin embargo, la implementación de un sistema de transposón como, por ejemplo, el sistema de transposón SB para terapia génica, por ejemplo, del sistema HSC está obstaculizado por la baja eficacia de la administración de ADN

plasmídico en células madre en general. A pesar de que la administración no viral de genes en HSC ha mejorado en gran medida mediante el uso de la nucleofección (Hamm y col., 2002; Gresch y col., 2004), aún se considera ineficaz en comparación con las tecnologías virales. En general, la eficacia de la administración de ADN plasmídico por electroporación está determinada por los parámetros físicos de la carga de vector incluyendo la cantidad y el tamaño del vector a introducir (Hu y col., 2014). Sin embargo, la administración de ADN plasmídico desnudo en las HSC resulta en una excesiva pérdida de viabilidad celular, lo que se incrementa en forma proporcional con la carga de ADN plasmídico (Levetzow y col., 2006). Más aún, se ha postulado que los motivos de dinucleótidos de CG (CpG) no metilados presentes en el esqueleto bacteriano de los vectores plasmídicos convencionales inducen respuestas inmunogénicas contra el ADN foráneo (Hemmi y col., 2000; Chuang y col., 2002; Hyde y col., 2008; Huerfano y col., 2013b). Finalmente, la presencia de un gen de resistencia a antibiótico en un vector usado para propósitos de terapia génica plantea nuevas preocupaciones de seguridad.

Una tecnología de plataforma basada en vectores que pueda potencialmente superar algunas de las limitaciones anteriores de la administración no viral de genes se basa en los minicírculos (MC). Los MC sin casetes de expresión mínima superenrollados que se obtienen de sus plásmidos parentales mediante un proceso de recombinación intramolecular, durante el cual se eliminan del vector la mayoría de las secuencias del esqueleto bacteriano (Darquet y col., 1997). Los vectores de MC por lo tanto tienen una reducción significativa de tamaño y están desprovistos de orígenes de replicación bacterianos y de genes de resistencia a antibióticos. Se ha demostrado que los MC mejoran la administración de genes a una variedad de líneas celulares *in vitro* (Darquet y col., 1997; Chabot y col., 2013; Kobelt y col., 2013), y al hígado (Chen y col., 2003b; Osborn y col., 2011), lungs (Vaysse y col., 2006), músculos (Darquet y col., 1999; Chabot y col., 2013) y tumores (Darquet y col., 1999; Kobelt y col., 2013) *in vivo*. Los MC han servido como método de administración no viral más eficiente y avanzado para modificación genética usando nucleasas de dedos de cinc (Dad y col., 2014), generación de células madre pluripotentes inducidas (Jia y col., 2010), en terapia de vacunación para aumentar las respuestas inmunológicas específicas contra VIH (Wang y col., 2014), y en la detección de cáncer de la sangre (Ronald y col., 2015). El mayor potencial de la administración basada en ADN minicircular también ha sido evidente en terapia génica preclínica para el tratamiento episomal de la mucopolisacaridosis de tipo I (Osborn y col., 2011). Un estudio de prueba de concepto sobre el sistema de transposón SB acoplado con tecnología de MC ha demostrado una robusta transposición de SB y e integración de transgenes en células HeLa (Sharma y col., 2013). Sin embargo, la tecnología de MC aún no se ha aplicado en el contexto de modificaciones estables no virales del genoma de HSC.

En consecuencia, a pesar de que en el estado de la técnica previo ya se describen medios y métodos para la administración de genes en células, aún se necesitan mejoras, en particular con respecto a la eficacia de la administración de genes y la bioseguridad de la modificación genética.

La presente solicitud aborda esta necesidad mediante la provisión de formas de realización tales como las que se definen en las reivindicaciones. La presente invención aborda los problemas de eficacia de la transferencia de genes (preferiblemente de una transferencia no viral de genes) a células (por ejemplo, en HSC), entre otras cosas, mediante las modificaciones de los componentes de un sistema de transposón (ejemplificado mediante el uso del sistema de transposón SB). La presente invención se basa principalmente en el sorprendente hallazgo de que el sistema de administración de genes se puede refinar en forma beneficiosa mediante la provisión de la transposasa SB100X como ARNm SNIM químicamente modificado caracterizado por una mayor estabilidad y una menor inmunogenicidad (Kormann y col., 2011). Más aún, la presente invención, en parte, se basa en el hallazgo de que la administración de genes mediada por transposones (SB), ante su suministro en la forma de vectores de MC, se asocia con una mayor eficacia de transferencia estable de genes y una menor citotoxicidad en comparación con un sistema basado en plásmidos, en particular en el caso en donde la transposasa se provee en la forma de ARN, más específicamente como ARN químicamente modificado.

Estos hallazgos conducen a las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones. En consecuencia, la presente invención se relaciona con un sistema de transposón que comprende

(a) una unidad de transposón que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) o repeticiones terminales directas (DTR) que flanquean una secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana; y

(b) un ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma;

en donde dicho ARN que codifica para dicha transposasa se caracteriza porque contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados.

En una forma de realización preferida, el ARN es un ARNm.

Un transposón (también denominado elemento transponible (TE o transposón)) como se usa de acuerdo con la presente invención se relaciona con una secuencia de ADN que puede cambiar su posición dentro del genoma. El descubrimiento de Barbara McClintock's acerca de estos genes saltarines la llevó a ganar el premio Nobel en 1983.

Un sistema de transposón designa a una combinación de un elemento transponible y una correspondiente transposasa que tiene la capacidad de transponerlo.

En general, se conocen dos diferentes sistemas de transposones.

5 Un sistema de transposón, es decir, los transposones de clase I, involucra un ARN intermediario. Los TE de clase I se copian en dos etapas: primero, se transcriben a partir de ADN a ARN, y el ARN producido luego se transcribe en forma reversa a ADN. Este ADN copiado se inserta entonces en una nueva posición en el genoma. El paso de transcripción reversa es catalizado por una transcriptasa reversa, que con frecuencia está codificada por el mismo TE.

10 El segundo sistema de transposón es un mecanismo de transposición de corte y pegado de TE de clase II que no incluye un ARN intermediario. Este sistema se describe en forma más detallada más adelante.

En la presente invención, están contemplados ambos tipos de sistemas de transposón mientras que el segundo sistema de transposón que usa un mecanismo de transposición de corte y pegado de TE de clase II es el preferido.

15 Un sistema de transposón de acuerdo con la presente invención comprende los siguientes dos componentes principales:

(a) una unidad de transposón que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) o repeticiones terminales directas (DTR) que flanquean una secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana; y

20 (b) un ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma.

En general, de acuerdo con el segundo sistema de transposón (TE de clase II), la transposición está catalizada por una enzima transposasa que tiene la capacidad de reconocer las correspondientes ITR o DTR de las unidades del transposón. La transposasa reconoce y se une específicamente a estos sitios diana de ITR o DTR en una secuencia de ADN. Durante el evento de transposición, la transposasa realiza un corte escalonado en el sitio diana que resulta en sobreextensiones de una hebra en el ADN en el extremo 5' o 3' (extremos cohesivos). Este paso corta el ADN, el que luego es ligado a un nuevo sitio diana. Este proceso implica la actividad de una ADN polimerasa que rellena las brechas y una ADN ligasa que subsiguientemente cierra el esqueleto de azúcar-fosfato.

30 Por lo tanto, el sistema de transposasa utiliza la interacción entre un transposón y su correspondiente transposasa que reconoce dichas ITR del transposón y transpone dicha secuencia de interés a dicho genoma.

En adelante, se describen en forma más detallada los componentes individuales del sistema de transposón de la presente invención.

35 La unidad de transposón básicamente contiene por lo menos dos componentes, a saber, las repeticiones terminales invertidas (ITR) o repeticiones terminales directas (DTR) que flanquean una secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana. Mientras que a continuación se describen estas ITR o DTR, el último de los conceptos, la "secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana" se describe en forma más detallada más adelante.

40 Con respecto al primer componente, es sabido que las repeticiones terminales invertidas (ITR o IR) en general se relacionan con una secuencia de nucleótidos seguida corriente abajo por su complemento reverso. En general, la secuencia de nucleótidos intermedia entre la secuencia inicial y el complemento reverso puede ser de cualquier longitud incluyendo cero.

45 Estas secuencias de ADN repetidas invertidas con frecuencia están en el rango entre un par de nucleótidos y el gen completo, mientras que la proximidad de las secuencias repetitivas varía entre ampliamente dispersas y simples disposiciones en tándem. Las secuencias repetidas cortas en tándem pueden existir entre solo unas pocas copias en una pequeña región hasta miles de copias dispersas por todo el genoma de la mayoría de los eucariotas. Las secuencias repetitivas de entre aproximadamente 10 y 100 pares de bases se conocen como minisatélites, mientras que las secuencias repetitivas más cortas se conocen que tienen principalmente entre 2 y 4 pares de bases se conocen como microsatélites. Las repeticiones más comunes incluyen las repeticiones de dinucleótidos, que tienen las bases AC en una hebra de ADN y GT en la hebra complementaria. Las repeticiones invertidas tienen varias funciones biológicamente importantes. De acuerdo con la presente invención, las mismas definen los límites de los transposones.

55 Como alternativa, en lugar de las ITR, puede haber repeticiones terminales directas o repeticiones directas (DTR o DR) que flanquean la secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana. Las DTR son un tipo de secuencia genética que consiste en dos o más repeticiones de una secuencia específica. Las repeticiones directas son secuencias nucleotídicas presentes en múltiples copias en el genoma. Existen varios tipos de secuencias repetitivas. Las repeticiones de ADN intercaladas (o dispersas) (secuencias repetitivas intercaladas) son copias de elementos transponibles intercaladas a lo largo del genoma. En oposición a las ITR, las repeticiones terminales directas están en la misma dirección. En general, existe una repetición directa cuando una secuencia se repite con el mismo patrón corriente abajo. Las repeticiones terminales invertidas se ubican en dirección opuesta entre sí.

60 En consecuencia, cada vez que se hace referencia en adelante a las ITR, estas ITR se pueden reemplazar por repeticiones terminales directas (DR), dependiendo de la correspondiente transposasa usada. Por lo tanto, si se usa una transposasa que reconoce DR, la unidad de transposón porta DR en lugar de ITR.

Incluso, en una forma de realización preferida, la unidad de transposón contiene ITR.

Como se explicará en forma más detallada más adelante, en una forma de realización preferida, el sistema de transposón de la presente invención se basa en un transposón *Sleeping Beauty*. Los transposones *Sleeping Beauty* pertenecen a la superfamilia de transposones Tc1/mariner. Las ITR de un transposón *Sleeping Beauty* portan un par de sitios de unión que contienen repeticiones directas (DR) cortas de 15-20 pb. A pesar de que una transposasa *Sleeping Beauty* se une a las ITR en una forma específica de secuencia, para la transposición se requieren pares de transposasa-sitios de unión tanto externos como internos (Mates y col., 2009).

Por lo tanto, como se describirá en forma más detallada más adelante, la unidad de transposón de un sistema de transposón de acuerdo con la presente invención preferiblemente se basa en un transposón *Sleeping Beauty* y contiene dos repeticiones directas (DR), preferiblemente DR imperfectas, dentro de cada repetición terminal invertida (ITR).

En consecuencia, de acuerdo con la presente invención, se prefiere que las repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean la secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana sean ITR que son reconocidas por una transposasa SB.

Más preferiblemente, una ITR de la unidad de transposón es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes una o más secuencias denominadas "Lo" y "Li", respectivamente, como DR:

Lo: TA / CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAG (SEQ ID NO:4);  
Li: TCCAGTGGGTCAGAAGTTTACATACACTAAGT (SEQ ID NO:5).

Esta ITR de la unidad de transposón no se limita en forma particular a contener la o las secuencias específicas anteriores de la SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:5 pero puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 4 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente. Como alternativa, esta ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 3 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente. Esta ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 2 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente. Más preferiblemente, esta ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta 1 sustitución en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente.

La ITR anterior de la unidad de transposón que tiene una o más de las sustituciones precedentes puede resultar en una ITR que tiene la misma capacidad, o una similar, de ser transpuesta por una transposasa SB como una ITR que contiene la SEQ ID NO:4 y/o la SEQ ID NO:5.

La otra ITR de la unidad de transposón preferiblemente puede ser una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes una o más secuencias denominadas "Ri" y "Ro", respectivamente, como DR:

Ri: CCCAGTG G GTCAG AAGTTTACATACACTCAAT (SEQ ID NO:6);  
Ro: TA / CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACCTTAG (SEQ ID NO:7).

Esta otra ITR de la unidad de transposón no se limita en forma particular a la o las secuencias específicas anteriores de la SEQ ID NO:6 y/o la SEQ ID NO:7 pero puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 4 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. Como alternativa, esta otra ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 3 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. Esta otra ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 2 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. Más preferiblemente, esta otra ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta 1 sustitución en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. La ITR anterior de la unidad de transposón que tiene una o más de las sustituciones precedentes puede resultar en una ITR que tiene la misma capacidad, o una similar, de ser transpuesta por una transposasa SB como una ITR que contiene la SEQ ID NO:6 y/o SEQ ID NO:7.

En una forma de realización preferida, dentro de cada una de las ITR que se describieron anteriormente, las repeticiones directas externas (llamadas "Lo" y "Ro", respectivamente) se localizan en la región del extremo del transposón mientras que las repeticiones directas internas (llamadas "Li" y "Ri", respectivamente) se localizan dentro del transposón. Preferiblemente, dentro de cada una de las ITR que se describieron anteriormente, existe un espaciador de entre aproximadamente 165 y 170 pb, más preferiblemente de entre aproximadamente 169 pb, entre las repeticiones internas y externas.

En una forma de realización más preferida, por lo menos una de las ITR de la unidad de transposón es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes secuencias consenso llamadas "DRo" y "DRi", respectivamente, como DR:

DRo (consenso): TA / CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACYTAAG (SEQ ID NO:8);

DRi (consenso): CAGTG G GTCAG AAGTTTACATACACTM ART (SEQ ID NO:9), en donde M puede ser A o C y R puede ser G o A.

5 Esta por lo menos una de las ITR de la unidad de transposón que es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes secuencias consenso llamadas "DRo" y "Dri", respectivamente, como DR no se limita en forma particular a la o las secuencias específicas anteriores de la SEQ ID NO:8 y/o la SEQ ID NO:9 sino que también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 4 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, respectivamente. Como alternativa, esta secuencia consenso de la ITR de la unidad de transposón de la presente invención también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 3 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9, respectivamente. Esta secuencia consenso de la ITR de la unidad de transposón de la presente invención también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 2 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9, respectivamente. Más preferiblemente, la secuencia consenso de la ITR de la unidad de transposón de la presente invención también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta 1 sustitución en comparación con la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9, respectivamente.

10 La por lo menos una de las ITR anteriores de la unidad de transposón que es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes secuencias consenso llamadas "DRo" y "Dri", respectivamente, como DR de la unidad de transposón que tiene una o más de las sustituciones precedentes, puede resultar en una ITR que tiene la misma capacidad, o una similar, de ser transpuesta por una transposasa SB como una ITR que contiene la SEQ ID NO:8 y/o la SEQ ID NO:9.

15 En una forma de realización preferida, dentro de la ITR que se describió anteriormente, la repetición directa consenso externa (llamada "DRo") se localiza en el extremo terminal del transposón mientras que la repetición directa consenso interna (llamada "Dri") se localiza dentro del transposón. Preferiblemente, dentro de cada una de estas ITR, existe un espaciador de entre aproximadamente 165 y 170 pb, más preferiblemente de entre aproximadamente 169 pb, entre la repetición directa consenso interna y externa.

20 La transposasa del sistema de transposasa tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia. En otras palabras, la transposasa reconoce dichas ITR o DTR, se une a dichas ITR o DTR y corta el transposón y transfiere el transposón (portando las ITR así como la secuencia de interés incluida a insertar en el genoma) a una molécula de ADN (es decir, el genoma de una célula diana). Esta molécula de ADN genómica se convierte en la receptora de dicho transposón transpuesto cuando se reconoce una secuencia específica, preferiblemente una secuencia TA. Subsiguientemente, como se mencionó anteriormente, durante el evento de transposición, la transposasa realiza un corte escalonado en el sitio diana que resulta en sobreextensiones de ADN se hebra individual en el extremo 5' o 3' terminal (extremos cohesivos). Este paso corta el transposón de ADN el cual es ligado luego en un nuevo sitio diana. Este proceso implica la actividad de una ADN polimerasa que rellena las brechas y una ADN ligasa que cierra el esqueleto de azúcar-fosfato, lo que conduce finalmente a la inserción del transposón en el genoma de la célula diana.

30 La presente invención no se limita particularmente a una combinación de una unidad de transposón específica que contiene ITR o DTR particulares y una correspondiente transposasa. Se puede usar cualquier combinación de una unidad de transposón específica que contenga ITR o DTR particulares y su correspondiente transposasa. En el estado de la técnica se conocen muchas unidades específicas de transposón que contienen ITR o DTR particulares y su correspondiente transposasa y se pueden usar de acuerdo con la presente invención.

45 En una forma de realización preferida, la unidad de transposón es un transposón no viral.

En adelante, se describe en forma más detallada el segundo componente del sistema de transposón, es decir, la transposasa codificada por el ARN.

50 Preferiblemente, el ARN que codifica para la transposasa de (b) del sistema de transposón de la presente invención, codifica para una transposasa que porta una señal de localización nuclear (NLS) que es requerida para importar la enzima transposasa desde el citoplasma en donde se elabora al núcleo en donde actúa.

55 La molécula de ARN que codifica para dicha transposasa de la presente invención contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Preferiblemente, la molécula de ARN de la presente invención que codifica para una transposasa contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados como se describe en WO 201 1/012316. Dichas moléculas de ARN también se conocen y comercializan como "SNIM<sup>®</sup>-RNA". Se informa que la molécula de ARN que se describe en WO 201 1/012316 muestra una mayor estabilidad y una menor inmunogenicidad. En una forma de realización preferida, en dicha molécula de ARN modificada que codifica para una transposasa, entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina están modificados. Los nucleótidos que contienen adenosina y guanósina pueden estar modificados. Los nucleótidos de adenosina y guanósina pueden estar parcialmente modificados o sin modificar, y los mismos preferiblemente están presentes en forma no modificada. Preferiblemente entre el 10 y el 35% de los nucleótidos de citidina y de uridina están modificados, y en forma particularmente preferida el contenido de nucleótidos de citidina modificados se ubica en el rango entre 7,5 y 25%, y el contenido de nucleótidos modificados de uridina en el rango

entre 7,5 y 25%. De hecho, se ha hallado que un contenido relativamente bajo, por ejemplo, solamente 10% de cada uno, de nucleótidos de citidina y de uridina modificados puede conseguir las propiedades deseadas.

Se prefiere en forma particular que los nucleótidos de citidina modificados sean residuos de 5-metilcitidina y los nucleótidos modificados de uridina sean residuos de 2-tiouridina. Más preferiblemente, el contenido de nucleótidos de citidina modificados y el contenido de nucleótidos modificados de uridina es de 25%, respectivamente.

5

La naturaleza de la modificación de los nucleósidos tiene un efecto sobre la estabilidad y por lo tanto el tiempo de vida y la actividad biológica del ARNm. Las modificaciones adecuadas se establecen en la siguiente tabla:

Nombre	Modificación de base (posición 5)	Modificación de azúcar (posición 2')	Naturalmente en el ARNm
<b>Uridina</b>			
5-metil uridina 5'-trifosfato (m5U)	CH <sub>3</sub>	-	no
5-iodouridina 5'-trifosfato (I5U)	I	-	no
5-bromouridina 5'-trifosfato (Br5U)	Br	-	no
2-tiouridina 5'-trifosfato (S4U)	S (en posición 2)	-	no
4-tiouridina 5'-trifosfato (S2U)	S (en posición 4)	-	no
2'-metil-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'm)	-	CH <sub>3</sub>	sí
2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'F)	-	F	no
<b>Citidina</b>			
5-metilcitidina 5'-trifosfato (m5C)	CH <sub>3</sub>	-	sí
5-iodocitidina 5'-trifosfato (I5U)	I	-	no
5-bromocitidina 5'-trifosfato (Br5U)	Br	-	no
2-tiocitidina 5'-trifosfato (S2C)	S (en posición 2)	-	no
2'-metil-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'm)	-	CH <sub>3</sub>	sí
2'-amino-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'F)	-	F	no
<b>Adenosina</b>			
N6-metiladenosina 5'-trifosfato (m6A)	CH <sub>3</sub> (en posición 6)	-	sí
N1-metiladenosina 5'-trifosfato (m1A)	CH <sub>3</sub> (en posición 1)	-	no
2'-0-metiladenosina 5'-trifosfato (A2'm)	-	CH <sub>3</sub>	sí
2'-amino-2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'F)	-	F	no
<b>Guanosina</b>			
N1-metilguanosina 5'-trifosfato (m1G)	CH <sub>3</sub> (en posición 1)	-	no
2'-0-metilguanosina 5'-trifosfato (G2'm)	-	CH <sub>3</sub>	sí
2'-amino-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'F)	-	F	no

10

Para el ARN de acuerdo con la invención, todos los nucleótidos de uridina o bien los nucleótidos de citidina se pueden modificar cada uno de la misma manera o también se puede usar una mezcla de nucleótidos modificados para cada uno. Los nucleótidos modificados pueden tener modificaciones de origen natural o de origen no natural. Se puede usar una mezcla de varios nucleótidos modificados. Por lo tanto, por ejemplo, una parte de los nucleótidos modificados pueden tener modificaciones naturales, mientras que otra parte tienen modificaciones de origen no natural, o bien se puede usar una mezcla de nucleótidos modificados de origen natural y/o de origen no natural. Además, una parte de los nucleótidos modificados pueden tener una modificación de base y otra parte una modificación de azúcar. De la misma manera, es posible que todas las modificaciones sean modificaciones de bases o que todas las modificaciones sean modificaciones de azúcar, o cualquier mezcla adecuada de los anteriores. Mediante la variación de las modificaciones, se pueden ajustar en forma selectiva la estabilidad y/o la duración de la acción del ARN de acuerdo con la invención.

15

20

En una forma de realización de la invención, se usan por lo menos dos modificaciones diferentes para un tipo de nucleótido, en donde uno tipo de los nucleótidos modificados tiene un grupo funcional a través del cual se pueden

unir otros grupos. También se pueden usar nucleótidos con grupos funcionales diferentes, con el objetivo de proveer sitios de unión para la conexión de diferentes grupos. Por lo tanto, por ejemplo, una parte de los nucleótidos modificados pueden portar un grupo azida, un grupo amina, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o algún otro grupo reactivo que sea adecuado para la reacción bajo condiciones predefinidas. El grupo funcional también puede ser tal que el mismo pueda activar, bajo ciertas condiciones, a un grupo naturalmente presente que tenga la capacidad de unirse, de manera de acoplar moléculas con funciones. También se pueden introducir nucleótidos que están modificados de manera de proveer sitios de unión, tales como modificaciones de adenosina o guanosina. La selección de las modificaciones adecuadas particulares y la selección de los sitios de unión a ofrecer como disponibles depende del tipo de grupos que se han de introducir y de la frecuencia con la que estos estarán presentes. Por lo tanto, el contenido de los nucleótidos provistos con grupos funcionales y/o activantes depende de cuan alto sea el contenido de grupos a acoplar y esto puede ser fácilmente determinado por parte de las personas con experiencia en el estado de la técnica. Como regla, el contenido de nucleótidos modificados con grupos funcionales y/o activantes, si están presentes, es entre 1 y 25% de los nucleótidos modificados. Si fuese necesario, las personas con experiencia en el estado de la técnica pueden determinar los grupos más adecuados en cada caso y el contenido óptimo de los mismos mediante experimentación de rutina.

En una forma de realización preferida, el ARN de acuerdo con la invención se caracteriza porque las uridinas modificadas se seleccionan entre 2-tiouridina, 5-metiluridina, pseudouridina, 5-metiluridina 5'-trifosfato (m5U), 5-idouridina 5'-trifosfato (I5U), 4-tiouridina 5'-trifosfato (S4U), 5-bromouridina 5'-trifosfato (Br5U), 2'-metil-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'm), 2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'NH<sub>2</sub>), 2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'N<sub>3</sub>) y 2'-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'F).

En otra forma de realización preferida, el ARN de acuerdo con la invención se caracteriza porque las citidinas modificadas se seleccionan entre 5-metilcitidina, 3-metilcitidina, 2-tio-citidina, 2'-metil-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'm), 2'-amino-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'F), 5-iodocitidina 5'-trifosfato (I5U), 5-bromocitidina 5'-trifosfato (Br5U) y 2'-azido-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'N<sub>3</sub>).

En la forma de realización más preferida, los ARN están químicamente modificados porque aproximadamente el 25% de los residuos de uridina son 2-tiouridina (s2U) y aproximadamente el 25% de los residuos de citidina son 5-metilcitidina (m5C).

En otra forma de realización, el ARN no está químicamente modificado.

En adelante, se describe en forma más detallada la "secuencia de interés a insertar en el genoma" de la unidad de transposón (a).

La secuencia de interés a insertar en el genoma no está particularmente limitada y puede ser cualquier secuencia deseada que se vaya a introducir, preferiblemente expresar, en una célula dada. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término "secuencia de interés a insertar en el genoma" se debe interpretar como indicando a cualquier molécula polinucleotídica que se pretenda introducir en el genoma de una célula diana, por ejemplo una secuencia que, si se introduce en una célula, se puede traducir a un polipéptido/proteína o fragmento de los mismos. Los términos "polipéptido" y "proteína" en la presente abarcan a cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos que están conectados a través de enlaces peptídicos y también incluye a péptidos y proteínas de fusión.

En una forma de realización preferida, la "secuencia de interés a insertar en el genoma" contiene una secuencia nucleotídica que codifica para un polipéptido/proteína o fragmento, incluso más preferiblemente un polipéptido/proteína o fragmento de los mismos cuya función en la célula o en la vecindad de la célula es necesaria o beneficiosa, por ejemplo, una proteína cuya carencia o forma defectuosa es un disparador para una enfermedad o patología, cuya provisión puede moderar o prevenir una enfermedad o una patología, o una proteína que puede promover un proceso que es beneficioso para el cuerpo, en una célula o su vecindad. La región codificante puede contener la secuencia para la proteína completa o una variante funcional de la misma. Además, la secuencia nucleotídica de la región codificante puede codificar para una proteína que actúa como un factor, inductor, regulados, estimulador o enzima, o fragmento funcional de los mismos, en donde esta proteína es una cuya función es necesaria para remediar un trastorno, en particular un trastorno metabólico o para iniciar procesos *in vivo* tales como la formación de nuevos vasos sanguíneos, tejidos, etc. En la presente, una variante funcional designa a un fragmento que en la célula puede tomar la función de la proteína cuya función es necesaria para la célula o cuya carencia o forma defectuosa es patológica.

En una forma de realización preferida, la "secuencia de interés a insertar en el genoma" codifica para un polipéptido o proteína terapéuticamente o farmacológicamente activa que tiene un efecto terapéutico o preventivo. Como tal, la unidad de transposón de la presente invención que comprende dicha "secuencia de interés a insertar en el genoma" puede usarse en una terapia con ácidos nucleicos y aplicaciones relacionadas. En este contexto, de acuerdo con la invención, dicha "secuencia de interés", una vez introducida en el genoma, se traduce y se transcribe a un polipéptido o una proteína codificada por dicha "secuencia de interés". Este polipéptido puede servir para compensar o complementar la expresión del gen endógeno, en particular en casos en donde un gen endógeno es defectuoso o silencioso, conduciendo a un producto nulo, insuficiente o defectuoso o disfuncional de la expresión génica tal como ocurre en el caso de muchas enfermedades metabólicas y hereditarias tales como la fibrosis quística, la hemofilia o la distrofia muscular, por nombrar algunas. Una eficacia incrementada de la traducción de dicha "secuencia de

interés" a un polipéptido, una vez introducida en el genoma, también puede servir para que el producto de su expresión interactúe o interfiera con cualquier proceso celular endógeno tal como la regulación de la expresión génica, la transducción de señales y otros procesos celulares. La expresión de dicha "secuencia de interés", una vez introducida en el genoma, también puede servir para dar origen a una respuesta inmunológica en el contexto del organismo en donde reside, o se hace residir, la célula transducida o transfectada. Los ejemplos son la modificación genética de células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas con el objetivo de hacerlas presentar un antígeno con propósitos de vacunación. Otro ejemplo es la expresión de dicha "secuencia de interés", una vez introducida en el genoma, en donde dicha secuencia de interés codifica para citoquinas. Por ejemplo, esto puede ser deseable en tumores con el objetivo de inducir una respuesta inmunológica específica de tumor. Más aún, la expresión de dicha "secuencia de interés", una vez introducida en el genoma, también puede servir para generar células genéticamente modificadas *in vivo* o *ex vivo* para terapias celulares tales como células T modificadas o precursores o células madre u otras células para medicina regenerativa.

En otras formas de realización preferidas, la "secuencia de interés" puede codificar para proteínas que tienen un rol en procesos de crecimiento y angiogénesis, que son por ejemplo necesarias para la regeneración controlada y que luego se pueden formar específicamente mediante la introducción de la "secuencia de interés" de acuerdo con la invención. Por ejemplo, esto puede ser útil en procesos de crecimiento o para el tratamiento de defectos óseos, defectos tisulares y en el contexto de implantación y trasplante.

Como ya se mencionó, el transposón que contiene las ITR o DTR que flanquean una secuencia de interés a insertar en el genoma se puede usar en forma apropiada en cualquier caso en donde se desee proveer al cuerpo un polipéptido o una proteína, que naturalmente estaría presente en el cuerpo pero que no está presente o lo está en forma deficiente o en una cantidad demasiado baja debido a defectos génicos o enfermedades. Las proteínas y los genes que codifican para las mismas, cuya deficiencia o defecto están asociados con una enfermedad, son conocidos. Se puede usar la respectiva versión intacta de la secuencia de interés que codifica para el polipéptido o la proteína intacta de acuerdo con la presente invención.

Se conocen numerosos trastornos genéticos causados por la mutación de un gen individual que son candidatos para estrategias terapéuticas. Los trastornos causados por mutaciones de genes individuales, tales como fibrosis quística, hemofilia y muchos otros, pueden ser dominantes o recesivos con respecto a la probabilidad de que un cierto rasgo aparezca en la descendencia. Mientras que un alelo dominante manifiesta un fenotipo en los individuos que tienen solamente una copia del alelo, para un alelo recesivo el individuo debe tener dos copias, una de cada progenitor, para lograr manifestarse. Por el contrario, los trastornos poligénicos están causados por dos o más genes y la manifestación de la respectiva enfermedad con frecuencia es fluida y asociada a factores ambientales. Los ejemplos de trastornos poligénicos son la hipertensión, el nivel elevado de colesterol, el cáncer, los trastornos neurodegenerativos, las enfermedades mentales y otras. Además, en estos casos, los transposones que portan una secuencia de uno o más de estos genes pueden ser beneficiosos para estos pacientes. Más aún, un trastorno genético no tiene la obligación de haber sido heredado a través de los genes parentales, sino que también puede estar causado por mutaciones nuevas. También en estos casos, los transposones que portan una secuencia que tiene la secuencia génica correcta pueden ser beneficiosos para los pacientes.

Un catálogo en línea actualmente con 22.993 entradas de Genes Humanos y Trastornos Genéticos junto con sus respectivos genes, y una descripción de sus fenotipos, se puede encontrar en la página web de ONIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (<http://onim.org>); las secuencias de cada uno están disponibles en la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Como ejemplos no limitantes, la siguiente **Tabla 1** enumera algunas enfermedades congénitas, y el o los correspondientes genes. Debido al alto grado de interacción de las vías de señalización celular, la mutación de un cierto gen causa una multiplicidad de síntomas patogénicos, de los cuales en la **Tabla 1** solo se enumera uno característico.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la "secuencia de interés" codifica para una proteína terapéutica en los términos de la presente invención.

En algunas formas de realización de la presente invención, la proteína terapéutica se selecciona a partir de las proteínas celulares que se enumeran en la **Tabla 1**. Por lo tanto, los transposones de la invención pueden comprender una secuencia de interés que codifica para una proteína celular terapéutica, en donde la proteína terapéutica codificada es una enumerada en la **Tabla 1**, o un homólogo de la misma.

En otra forma de realización de la presente invención, la proteína terapéutica se selecciona a partir de las proteínas secretadas que se enumeran en la **Tabla 1**. Por lo tanto, los transposones de la invención pueden comprender una secuencia de interés que codifica para una proteína de fusión terapéutica, en donde la proteína terapéutica codificada o un homólogo de la misma es una que se lista en la **Tabla 1**, y la segunda proteína es un péptido señal que permite la secreción de la proteína terapéutica. Un péptido señal es una secuencia de aminoácidos corta, típicamente de entre 5 y 30 aminoácidos de longitud presente en el extremo N terminal de dicha proteína terapéutica y que conduce a la proteína de fusión hacia la vía de secreción celular a través de ciertas organelas (es decir el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi o los endosomas). Por lo tanto, dicha proteína de fusión es secretada a partir de la célula o a partir de una organela celular o se inserta en una membrana celular (por ejemplo, proteínas de múltiples segmentos transmembrana) en un compartimiento celular o en la superficie de la célula.

Por lo tanto, en formas de realización preferidas de la presente invención la "secuencia de interés" puede corresponder, a título enunciativo no taxativo, a los siguientes genes que causan, predisponen o protegen de enfermedades. Los ejemplos no limitantes de dichos trastornos que se pueden tratar (o prevenir) incluyen aquellos

en donde dicho polipéptido, proteína o péptido se selecciona del grupo que consiste en aquellos que se especifican en la siguiente **Tabla 1**.

En algunas formas de realización, la "secuencia de interés", una vez introducida en el genoma, se puede traducir a una proteína parcial o de longitud completa que comprende una actividad celular a un nivel igual o superior al de la proteína nativa. En algunas formas de realización, la "secuencia de interés" codifica para un polipéptido, proteína o péptido terapéuticamente o farmacológicamente activo que tiene un efecto terapéutico o preventivo, en donde dicho polipéptido, proteína o péptido se selecciona del grupo que consiste en aquellos que se especifican en la siguiente **Tabla 1**. La "secuencia de interés" se puede usar para expresar una proteína parcial o de longitud completa con actividad celular de un nivel igual o inferior que el de la proteína nativa.

**Tabla 1:** Ejemplos no taxativos de genes y trastornos genéticos humanos

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
<b>Enfermedades de la sangre</b>		
Anemia de Fanconi	Anemia y neutropenia, evidencia que está afectado un mecanismo de reparación de ADN	FANCA, autosómico recesivo
Hemofilia-A	Hemorragia anormal	Factor de coagulación VIII, cromosoma X recesivo
Hemofilia-B	Hemorragia anormal	Factor de coagulación IX, cromosoma X recesivo
Esferocitosis hereditaria (varios tipos)	eritrocitos de forma esférica (esferocitos)	Anquirina (ANK1)
Hemoglobinuria nocturna paroxística	Anemia y presencia de sangre en la orina	PIG-A, cromosoma X
Porfiria cutánea tardía	Sobreproducción de hemo, sobrecarga de hierro	Uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD), autosómico recesivo
Inmunodeficiencia combinada severa (SCID)	Inmunodeficiencia severa de la inmunidad humoral y celular debido a una síntesis de ADN deteriorada	Adenosina desaminasa, autosómico recesivo
Anemia de células falciformes	Hemoglobina anormal (HbS)	$\beta$ -hemoglobina (HB), autosómico recesivo
Talasemia (formas $\alpha$ y $\beta$ )	Falta de $\alpha$ o $\beta$ hemoglobina que da como resultado una anemia	Supresión de HBA1 y/o HBA2
Enfermedad de Von Willebrand (tres tipos conocidos, el Tipo- III es el más severo)	Hemorragia anormal, hemorragia similar a la hemofilia A y B	Formas autosómica dominante y recesiva
<b>Cáncer</b>		
Melanoma maligno	Mutación P16 conduce a una proliferación descontrolada de fibroblastos	Inhibidor 2 de quinasa dependiente de ciclase (CDKN2)
Neurofibromatosis (2 tipos)	Tumores benignos sobre los nervios auditivos que conducen a sordera	NF1, NF2, autosómicos dominantes
<b>Sordera (Oído)</b>		
Sordera	Pérdida de audición	Sordera-1 <sup>a</sup> (DFNB1), autosómico recesivo
Síndrome de Pendred	Pérdida de audición	Pendrina (PDS), autosómico recesivo
<b>Corazón</b>		
Telangiectasia con ataxia (	Reparación alterada de daños del ADN,	ATM,
Aterosclerosis	Aumento de colesterol en sangre	apoE,
Síndrome LQT (QT largo)	Defecto de los canales de potasio	LQT1 y otros genes
Síndrome de Von-Hippel Lindau	Crecimiento anormal de los vasos sanguíneos, puede conducir a cáncer	VHL, autosómico dominante
Síndrome Beuren de William	Supresión de elastina que resulta en defectos vasculares, estenosis aórtica supra valvular	Supresión de los genes de elastina y LIM quinasa

<b>Trastornos metabólicos y enfermedades del almacenamiento de glucógeno</b>		
Adrenoleucodistrofia	Transporte y metabolismo alterados de ácidos grasos	ABCD1, cromosoma X
Alcaptonuria	Defecto del metabolismo de nitrógeno, la orina se vuelve oscura con la exposición al oxígeno	Homogentísico oxidasa, autosómico recesivo
Diabetes tipo I	Producción alterada de insulina	IDDM1, IDDM2, GCK..
Galactosemia	Trastorno del metabolismo de la galactosa	Gen de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), autosómico recesivo
Enfermedad de Gauche	Alteración del metabolismo de las grasas	Glucocerebrosidasa
Malabsorción de glucosa-galactosidasa	Transporte alterado de glucosa y galactosa fuera del lumen intestinal que da como resultado diarrea	SGLT1, autosómico recesivo
Enfermedad de almacenamiento del glucógeno Tipo I, enfermedad de Von-Gierke	Acumulación de glucosa en hígado y riñón	Glucosa-6-fosfatasa, autosómico recesivo
Enfermedad del almacenamiento de glucógeno Tipo II, enfermedad de Pompe	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, cardiomegalia	$\alpha$ -1-glucosidasa, autosómico recesivo
Enfermedad del almacenamiento de glucógeno Tipo III, enfermedad de Cori	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, hepatomegalia	Enzima desramificadora, autosómico recesivo
Enfermedad del almacenamiento de glucógeno Tipo II, enfermedad de McArdle	Las células musculares no pueden utilizar glucógeno	Fosforilasa del músculo, autosómico recesivo
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Incapacidad para conservar glutatión que conduce a anemia hemolítica	G6PD, cromosoma X recesivo
Hemocromatosis hereditaria (4 tipos)	Exceso de hierro en el cuerpo (en especial en el hígado) debido a una absorción excesiva de hierro en el intestino	Hemocromatosis (HFE)
Homocistinuria	Metabolismo defectuoso del nitrógeno	Cistación sintetasa defectuosa, autosómico recesivo
Síndrome de Lesh Nyhan	Acumulación de ácido úrico que conduce a gota, piedras de urato y pérdida muscular	HPRT1, cromosoma X
Enfermedad del jarabe de arce (orina con olor)	Defectos del metabolismo de aminoácidos que conducen a la acumulación de $\alpha$ -cetoácidos y muerte durante los primeros meses si no es tratada	Alfa-deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH)
Síndrome de Menkes	Capacidad reducida para absorber cobre, conduce a muerte en la infancia si no es tratada	Cromosoma X
Obesidad	Peso corporal elevado	Poligénico, niveles elevados de leptina pueden cumplir un rol
Fenilcetonuria	Incapacidad para degradar fenilalanina en tirosina que conduce al retraso mental	Fenilalanina hidroxilasa (PAH), autosómico recesivo
Enfermedad de Tangier	Niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad en plasma	Gen del casete 1 de unión a ATP (ABCA1)
Síndrome de Zellweger (conduce a muerte en niños)	Niveles altos de hierro y cobre en sangre	PXR1 (receptor sobre la superficie de peroxisomas)
Enfermedad de Wilson	Acumulación de cobre en cerebro e hígado	ATP7B (ATPasa tipo P), autosómico recesivo
<b>Sistema musculoesquelético</b>		
Acondroplasia	Estatura baja con cabeza grande debido a una proliferación lenta de condrocitos	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGF3R),

Síndrome de Charcot-Marie-Tooth y su forma más severa, el síndrome de Dejerine-Sottas	Degeneración de los músculos en miembros inferiores	Diferentes formas causadas por distintas mutaciones genéticas, autosómico recesivo y cromosoma X
Síndrome de Cockayne (2 tipos)	Envejecimiento prematuro y baja estatura, pérdida de reparación de ADN "al vuelo"	Proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 8 (ERCC8)
Displasia condroectodérmica	Malformación de huesos y polidactilia	EVC, autosómico recesivo
Displasia distrófica (DTD)	Malformación de manos, defecto del transportador de sulfato	Gen DTDST
Distrofia muscular de Duchenne	Agrandamiento del tejido muscular con subsiguiente pérdida de función	DMD, cromosoma X recesivo
Fibrodisplasia osificante progresiva	Formación ósea heterotópica	NOG, BMP, autosómicos dominantes
Ataxia de Friedreich	Agrandamiento del corazón y pérdida progresiva de la coordinación muscular	Frataxina, autosómico recesivo
Síndrome de Marfan	Trastorno del tejido conectivo debido a deficiencia de fibrilina	Fibrilina 1 (FBN), autosómico dominante
Distrofia miotónica (comienzo en adulto jóvenes)	Defecto de proteína quinasas en células del músculo esquelético	Proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK), autosómico dominante
Osteogénesis imperfecta (varios tipos)	Defecto en la formación de colágeno tipo I que conduce a múltiples fracturas después del nacimiento	COL1A1, COL1A2
Síndrome de Prader-Willi	Tono muscular disminuido y retraso mental	SNRPN (ribonucleoproteína pequeña N) eliminada debido a una supresión del cromosoma 15
<b>Neuronas y cerebro</b>		
Enfermedad de Alzheimer	Mayor producción de amiloide, incapacidad progresiva para recordar hechos	Poligénico, PS1, PS2, ...
Esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (varias formas)	Degeneración progresiva de las neuronas motoras (defecto en la eliminación de radicales de superóxido)	Superóxido dismutasa 1 (SOD1), varios genes involucrados
Síndrome de Angelman	Retraso mental con risa inadecuada	Impronta genómica en el cromosoma 15
Piruvato deshidrogenasa	Defectos neurológicos si no se trata	Piruvato deshidrogenasa, autosómico recesivo
Enfermedad de Refsum	Acumulación de ácido fitánico que conduce a neuropatía periférica	Futanoil-CoA hidroxilasa (PHYH), autosómico recesivo
Síndrome de Rett	Retraso mental con desarrollo detenido entre los 6 y 18 meses de edad	Proteína de unión a metil-CpG-2 (MECP2), cromosoma X dominante
Enfermedad de Tay-Sachs (varias formas de severidad)	Degradación alterada del gangliósido GM2 que conduce a daño neurológico	HEXA ((3-hexosaminidasa A), autosómico recesivo
Enfermedad de LaFora	Forma agresiva de epilepsia	EPM2A, autosómico recesivo
Temblor esencial (formas variables)	Temblor incontrolable	ETM1, ETM2, autosómicos dominantes
Síndrome del X frágil	Falta de la proteína de unión al ARN de FMR1, retraso mental	El gen FMR1 no se expresa debido a una amplificación CGG en la región 5' UTR
Enfermedad de Huntington	Demencia progresiva con inicio en edad adulta	HTT (Huntington), autosómico dominante
<b>Intestino</b>		

Síndrome de Bartter (3 tipos)	Enfermedad renal	Gen B de canales de cloruro de riñón (CLCNKB), autosómico recesivo
Enfermedad de riñón poliquístico (2 tipos)	Enfermedad renal	PDK1, PDK2, autosómicos dominantes, también hay una forma autosómica recesiva conocida (ARPKD)
<b>Pulmón</b>		
Alfa-1-antitripsina	Alvéolos defectuosos debido a una liberación descontrolada de elastasa	SERPINA1, autosómico recesivo
Asma	Trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias	Poligénico
Fibrosis quística	Mucoide excesivamente viscoso debido a un transporte defectuoso del ion Cl-	CFTR (regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística), autosómico recesivo
Disfunción del metabolismo tensioactivo (varios tipos)	Los recién nacidos son de peso corporal normal, pero ninguno puede inflar	Transportador del casete de unión a ATP (ABCA3)
<b>Enfermedades de almacenamiento lisosómico</b>		
Enfermedad de Fabry	Entre otros, lesiones de la piel debido a acumulación de trihexóxido de ceramida	α-galactosidasa A, cromosoma X recesivo
Enfermedad de Gaucher Tipo-I: forma adulta (vida normal con tratamiento) Tipo-II: forma infantil (muerte antes del primer año) Tipo-III: forma juvenil (comienzo en la infancia temprana, menos severa que el Tipo-II)	Acumulación de glucocerebrósidos (gangliósidos, esfingolípidos)	Glucocerebrosidasa, autosómico recesivo,
Síndrome de Hunter	Acumulación de mucopolisacáridos	L-iduronosulfato sulfatasa, cromosoma X recesivo
Síndrome de Hurler (muerte cerca de los 10 años de edad)	Acumulación de mucopolisacáridos	α-L-iduronidasa, autosómico recesivo
Enfermedad de Niemann-Pick (tres formas distintas, A, B, C)	Defectos en la liberación de colesterol de los lisosomas, acumulación de esfingomiélin	esfingomiélinasa, autosómico recesivo
Enfermedad de Tay-Sachs (muerte cerca de los 4 años de edad)	Acumulación del gangliósido G <sub>M2</sub> en las células neuronales	Hexosaminidasa A, autosómico recesivo
<b>Piel</b>		
Albinismo	Metabolismo defectuoso del nitrógeno	Deficiencia de tirosinasa, autosómico recesivo
Albinismo, oculocutáneo, tipo II	Biosíntesis reducida del pigmento melanina	OCA2, autosómico recesivo
Síndrome de Ehlers-Danlos (varios tipos)	Hernia diafragmática común, desprendimiento de retina	Varios defectos en la síntesis de colágeno
Enfermedad de Hartnup	Defecto en la captación de triptófano en el tracto gastrointestinal, piel sensible a la luz	SLC6A19, autosómico recesivo
Telangiectasia hemorrágica hereditaria, Síndrome de Osler-Weber-Rendu	Telangiectasia de la piel y las membranas mucosas	Endoglin (ENG), autosómico dominante
Hipercolesterolemia, familiar	Aumento del colesterol en suero unido a la lipoproteína de baja densidad, acumulación en la piel y arteriosclerosis	Receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), apolipoproteína B (APOB), autosómico dominante
Xeroderma pigmentosa	Defectos de piel y melanomas debido a exposición a UV	Reparación defectuosa de ADN, autosómico recesivo
Calvicie de patrón masculino	Conversión alterada de testosterona en dihidrotestosterona en la piel	5-α-reductasa

En la **Tabla 1** precedente se muestran ejemplos de genes en los cuales un defecto conduce a una enfermedad que puede ser tratada con el transposón de la presente invención, una vez introducido en el genoma de una célula, en donde el transposón comprende una "secuencia de interés" que codifica una versión intacta de la proteína o un fragmento funcional de la misma de los genes defectuosos divulgados precedentemente. En formas de realización particularmente preferidas, se pueden mencionar enfermedades hereditarias que afectan, por ejemplo, los pulmones, tales como deficiencia de SPB (proteína tensioactiva B), deficiencia de ABCA3, fibrosis quística y deficiencia de antitripsina  $\alpha 1$ , o que afectan las proteínas plasmáticas (por ejemplo, hemocromatosis congénita (deficiencia de hepcidina), púrpura trombocitopénica trombótica (TPP, deficiencia de ADAMTS 13) y causan defectos de coagulación (por ejemplo, hemofilia a y b) y defectos del complemento (por ejemplo, deficiencia de la proteína C), defectos inmunológicos tales como, por ejemplo, SCID (causan muchas mutaciones en diferentes genes tales como: RAG1, RAG2, JAK3, IL7R, CD45, CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ) o por deficiencias debido a la falta de adenosina desaminasa, por ejemplo (ADA-SCID), granulomatosis séptica (por ejemplo, causada por mutaciones del gen gp-91-phox, el gen p47-phox, el gen p67-phox o el gen p33-phox) y enfermedades de almacenamiento tales como la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Krabbe, MPS I, MPS II (síndrome de Hunter), MPS VI, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II o mucopolisacaridosis.

Otros trastornos para los cuales la presente invención que comprende una "secuencia de interés" puede ser de utilidad incluyen trastornos tales como atrofia muscular espinal (SMA) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ALS); galactosemia relacionada con GALT; fibrosis quística (CF); trastornos relacionados con SLC3A1, que incluyen cistinuria; trastornos relacionados con COL4A5, incluido el síndrome de Alport; deficiencias de la galactocerebrosidasa; adrenoleucodistrofia y adrenomieloneuropatía ligadas al cromosoma X; ataxia de Friedreich; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; TSC1 y esclerosis tuberosa relacionada con TSC2; síndrome B de Sanfilippo (MPS NIB); cistinosis relacionada con CTNS; los trastornos relacionados con FMR1 que incluyen síndrome de X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociada a X frágil y síndrome de insuficiencia ovárica prematura por X frágil; síndrome de Prader-Willi; telangiectasia hemorrágica hereditaria (AT); enfermedad de Niemann-Pick tipo C1; las enfermedades relacionadas con las lipofuscinoses ceroides neuronales, incluidas la lipofuscinoses neuronal ceroidea juvenil (JNCL), la enfermedad de Batten juvenil, la enfermedad de Santavuori-Haltia, la enfermedad de Jansky-Bielschowsky y las deficiencias de PTT-1 y TPP1; EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y ataxia infantil relacionada con EIF2B5 con hipomielinización del sistema nervioso central/sustancia blanca evanescente; ataxia episódica tipo 2 relacionada con CACNA1A y CACNB4; trastornos relacionados con MECP2, incluidos el síndrome de Rett clásico, encefalopatía neonatal grave relacionada con MECP2 y el síndrome PPM-X; síndrome de Rett atípico relacionado con CDKL5; enfermedad de Kennedy (SBMA); arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3 con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); trastornos convulsivos relacionados con SCN1A y SCN1 B; trastornos relacionados con la polimerasa G, que incluyen el síndrome de Alpers-Huttenlocher, neuropatía atáxica sensorial relacionada con POLG, disartria y oftalmoparesia, y oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante y recesiva con supresiones de ADN mitocondrial; hipoplasia suprarrenal ligada a X; agammaglobulinemia ligada a X; enfermedad de Fabry; y la enfermedad de Wilson.

En todas estas enfermedades, hay una proteína, por ejemplo, una enzima, defectuosa que puede ser tratada mediante un tratamiento con el sistema de transposones de acuerdo con la invención, el cual permite que la proteína codificada por el gen defectuoso o un fragmento funcional del mismo se vuelva disponible. Las terapias de reemplazo de transcritos/terapias de reemplazo de enzimas no afectan el defecto genético subyacente, pero aumentan la concentración de la enzima que es deficiente en el paciente. A modo de ejemplo, en la enfermedad de Pompe, la terapia de reemplazo de transcritos/terapia de reemplazo de enzimas reemplaza a la enzima lisosómica deficiente, ácido alfa-glucosidasa (GAA).

Por lo tanto, los ejemplos no taxativos de proteínas que pueden ser codificados por la "secuencia de interés" de acuerdo con la invención comprenden eritropoyetina (EPO), hormona de crecimiento (somatotropina, hGH), regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística (CFTR), factores de crecimiento tales como GM-SCF, G-CSF, MPS, proteína C, hepcidina, ABCA3 y proteína tensioactiva B. Otros ejemplos de enfermedades que pueden ser tratadas con el sistema de transposones de acuerdo con la invención comprenden hemofilia A B, enfermedad de Fabry, CGD, ADAMTS13, enfermedad de Hurler, A- $\gamma$ -globulinemia mediada por el cromosoma X, inmunodeficiencia relacionada con la adenosina desaminasa y síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido, que está relacionado con SP-B. Con particular preferencia, la "secuencia de interés" del transposón de acuerdo con la invención contiene la secuencia de la proteína tensioactiva B (SP-B) o de la eritropoyetina. Otros ejemplos de proteínas que pueden ser codificadas por la "secuencia de interés" de la molécula de ARN de acuerdo con la invención comprenden factores de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana hGH, BMP-2 o factores de angiogénesis.

Como alternativa la "secuencia de interés" puede codificar anticuerpos de longitud completa o anticuerpos más pequeños (por ejemplo, ambas cadenas pesada y liviana) para conferir inmunidad a un sujeto. En otra forma de realización, la "secuencia de interés" puede codificar un anticuerpo monoclonal o policlonal funcional, que puede ser de utilidad para el direccionamiento y/o la inactivación de un blanco biológico (por ejemplo, una citoquina estimulante, tal como el factor de necrosis tumoral). De manera similar, la "secuencia de interés" puede codificar, por ejemplo, anticuerpos anti-factores nefróticos funcionales que son de utilidad para el tratamiento de la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II o del síndrome urémico hemolítico agudo o, como alternativa, puede codificar anticuerpos anti-factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que pueden ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades mediadas por VEGF, tal como el cáncer.

Como una alternativa a lo mencionado precedentemente, la secuencia de interés que se insertará en el genoma es una secuencia que no será expresada como una proteína o un polipéptido. Por lo tanto, el término “secuencia de interés a insertar en el genoma” no solo se debe interpretar como cualquier molécula de polinucleótidos que se pretende introducir en el genoma de una célula blanco, es decir, una secuencia que, si se introduce en una célula, se pueda traducir en un polipéptido/proteína o un fragmento de ellos. Más bien, también se contempla que la secuencia de interés a insertar en el genoma sea una secuencia que solo se transcribe en un ARN (funcional), en donde dicho ARN es el producto final (y, por lo tanto, no requiere traducción). En este contexto, se prevé que la secuencia de interés a insertar en el genoma preferiblemente proporcione la información genética para una secuencia de ARN u otra secuencia de ribonucleótidos deseada.

Aún más, también se contempla que la secuencia de interés a insertar en el genoma sea una secuencia que no se transcribe en una molécula de ARN. En realidad, dicha secuencia de interés a insertar en el genoma es una secuencia no codificante, preferiblemente un casete de interrupción de genes. En este sentido, la secuencia de interés a insertar en el genoma preferiblemente será una secuencia que se usará (preferiblemente de manera específica) para noquear un gene de interés o se usará en una mutagénesis aleatoria. Por consiguiente, dicha secuencia de interés a insertar en el genoma que es una secuencia no codificante se puede usar en una mutagénesis de inserción o en una mutagénesis con transposones. Los correspondientes casetes de interrupción de genes adecuados son conocidos en el estado de la técnica.

La secuencia de interés a insertar en el genoma que es una secuencia no codificante preferiblemente se puede combinar con un gen marcador que codifica un marcador y que permite la detección y el aislamiento de aquellas células blanco que han integrado la secuencia de interés en el genoma y, por lo tanto, albergan un gen noqueado.

En una forma de realización preferida, la secuencia de interés contiene elementos o secuencias de control adicionales localizados en dirección 5' con respecto a la región codificante que codifica un polipéptido deseado que permitirá traducir y/o transcribir el producto deseado en una célula dada.

Si se desea expresar una proteína o un polipéptido en una célula dada, preferiblemente se introducirá un promotor adecuado, opcionalmente una secuencia potenciadora, una señal poli-A y una secuencia UTR, para asegurar la expresión (es decir, la transcripción y traducción). Estas secuencias son bien conocidas por los especialistas en el estado de la técnica.

Las secuencias promotoras reguladoras aseguran el inicio de la transcripción y, opcionalmente, las señales poli-A aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización de la transcripción, en tanto las secuencias UTR cumplen un rol en la regulación de la estabilidad del ARNm y en particular (en el inicio) de la traducción del ARNm.

Si se desea expresar una molécula de ARN como producto final, en una forma de realización preferida, la secuencia de interés contiene elementos de control adicionales seleccionados del grupo que consiste en una secuencia promotora reguladora y una secuencia potenciadora.

Si se desea introducir una secuencia no codificante en el genoma, no se necesitarán elementos o secuencias de control adicionales.

En la unidad del transposón, la posición de las ITR o DTR flanqueadoras en relación con la secuencia de interés a insertar en el genoma no está particularmente limitada. Por lo tanto, entre las ITR o DTR flanqueadoras y la secuencia de interés a insertar en el genoma puede haber un espacio o un hueco relleno con uno o más nucleótidos G, A, U y/o C que no forman parte de las ITR o DTR y la secuencia de interés a insertar en el genoma.

En este contexto, “uno o más nucleótidos G, A, U y/o C” significa que el espacio o hueco entre las ITR o DTR y la secuencia de interés a insertar en el genoma en el transposón de la presente invención están rellenos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos G, A, U y/o C. En otras formas de realización preferidas, el espacio o hueco en el transposón de la presente invención, entre las ITR o DTR y la secuencia de interés a insertar en el genoma, se rellena con 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o 110 o más nucleótidos G, A, U y/o C.

Sin embargo, en una forma de realización preferida, las ITR o DTR se ubican directamente en posición adyacente a la secuencia de interés a insertar en el genoma, es decir, directamente aguas arriba y aguas abajo de la secuencia de interés a insertar en el genoma.

En una forma de realización preferida, de acuerdo con lo mencionado, la unidad del transposón de (a) de la presente invención se encuentra en la forma de un minicírculo.

Los minicírculos son derivados plasmídicos circulares pequeños (~4kb) que se han liberado parcialmente de las partes de vectores procariontes. Preferiblemente, los minicírculos se han liberado de todas las partes de vectores procariontes. En el contexto de la presente invención, estos minicírculos se pueden aplicar en forma beneficiosa como transportadores de transgenes para vehicular la unidad de transposón de (a) a la modificación genética de células de mamífero, con la ventaja de que, debido a que no contienen secuencias de ADN bacterianas, es menos probable que se perciban como foráneos y que se destruyan. El tamaño más pequeño de los minicírculos también extiende su capacidad de clonado y facilita su administración a las células.

La preparación de los minicírculos es conocida en el estado de la técnica y comúnmente sigue un procedimiento de dos pasos:

Primero, se produce un plásmido parental (plásmido bacteriano con insertos eucariotas), por ejemplo, en *E. coli*. Segundo, se induce una recombinasa específica de sitio al final del este proceso. Estos pasos son seguidos por la escisión de las partes procariontes del vector a través de dos secuencias diana de recombinasa en ambos extremos del inserto lo que resulta en la recuperación del minicírculo (vehículo para la modificación altamente eficaz de la célula receptora) y el miniplásmido mediante electroforesis en gel capilar (CGE).

El minicírculo purificado portando la unidad de transposón de la presente invención se puede transferir luego a la célula diana receptora, por ejemplo, mediante transfección o lipofección concomitantemente con el ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer las ITR o DTR de la unidad de transposón.

5 Los minicírculos convencionales carecen de origen de replicación, de manera que no se replican dentro de las células diana y los genes codificados desaparecerán a medida que la célula se divide.

10 El minicírculo de la presente invención puede tener un tamaño en el rango entre 500 y 15.000 pb, y puede tener, por ejemplo, un tamaño de 500 pb, 1.000 pb, 2.000 pb, 2.500 pb, 3.000 pb, 4.000 pb, 5.000 pb, 6.000 pb, 7.000 pb, 8.000 pb, 10.000 pb, 11.000 pb, 12.000 pb o 15.000 pb. Los tamaños preferidos son entre 1.000 y 6.000 pb, más preferidos entre 2.000 y 4.000 pb. Ha de ser claro para las personas con experiencia que el tamaño se basa principalmente en el tamaño de la secuencia de interés a introducir en el genoma. Como contenido mínimo, el minicírculo contiene dicha secuencia de interés a introducir en el genoma, flanqueada por las ITR o DTR, es decir, la unidad de transposón de la presente invención.

15 En una forma de realización preferida, el sistema de transposón de la presente invención es un sistema de transposón *SLEEPING BEAUTY* (SB). Este sistema es conocido en el estado de la técnica y, por ejemplo, se describe en Aronovich y col. En *Human Molecular Genetics* 20, Review Issue 1 2011.

El sistema de transposón *Sleeping Beauty* es un transposón de ADN sintético diseñado para introducir secuencias de ADN definidas de manera precisa en los cromosomas de animales vertebrados con el propósito de introducir nuevos rasgos y descubrir nuevos genes y sus funciones.

20 El sistema de transposón *Sleeping Beauty* está compuesto por una transposasa *Sleeping Beauty* (SB) y un transposón que fue diseñado en 1997 para insertar secuencias específicas de ADN en genomas de animales vertebrados. Este transposón de ADN transloca de un sitio del ADN a otro de una manera simple de corte y empalme. Tal como ya se describió precedentemente, la transposición es un proceso preciso en el cual un segmento de ADN definido es escindido de una molécula de ADN y es movido a otro sitio en la misma molécula de ADN o genoma o diferente.

25 Tal como hacen otras transposasas tipo Tc1/mariner, la transposasa SB inserta un transposón en un par de bases dinucleótido TA en una secuencia de ADN receptora. El sitio de inserción puede ser en cualquier lugar en la misma molécula de ADN, o en otra molécula de ADN (o cromosoma). En los genomas de mamíferos, incluyendo los humanos, hay aproximadamente 200 millones de sitios TA. El sitio de inserción TA es duplicado en el proceso de integración de transposón. Esta duplicación de la secuencia TA es una característica de la transposición y se usa para determinar el mecanismo en algunos experimentos. En general, la transposasa puede estar codificada en el transposón o la transposasa puede ser provista por otra fuente, en cuyo caso el transposón se vuelve un elemento no autónomo. En la presente invención, la transposasa es provista por un ARN que codifica para dicha transposasa en donde dicho ARN tiene las modificaciones descritas precedentemente.

30 Los transposones no autónomos, como en la presente invención, son más útiles como herramientas genéticas ya que después de la inserción no pueden continuar de manera independiente escindiéndose y reinsertándose. Todos los transposones de ADN identificados en el genoma humano y otros genomas de mamífero son no autónomos ya que, aunque contienen los genes de transposasa, los genes no son funcionales y no tienen la capacidad de generar una transposasa que pueda movilizar el transposón.

40 El gen de transposasa resucitado del sistema SB fue nombrado "*Sleeping Beauty* (SB)" debido a que fue regresado a la actividad desde un sueño evolutivo prolongado. El sistema de transposón SB es sintético ya que la transposasa SB fue reconstruida a partir de secuencias de transposasa extintas (fósiles) que pertenecían a la clase Tc1/mariner de transposones encontrados en los genomas de peces salmónidos. Como en los humanos, en donde aproximadamente 20.000 transposones inactivos del tipo Tc1/mariner que comprenden casi el 3% del genoma humano, los genes de transposasa encontrados en peces han sido inactivos por más de 10 millones de años debido a mutaciones acumuladas. La reconstrucción de transposasa SB fue en base al concepto de que hubo un transposón similar a Tc1 primordial que fue el ancestro de las secuencias encontradas en los genomas de peces. A pesar de que hubo muchas secuencias que se parecieron a los transposones Tc-1 en todos los genomas de peces estudiados, las secuencias de transposón resultaron todas inactivas debido a mutaciones. Asumiendo que las variaciones en las secuencias fueron debidas a mutaciones independientes que se acumularon en los diferentes transposones, se postuló un transposón ancestral putativo.

45 La construcción de la transposasa comenzó por fusión de partes de dos secuencias de transposón inactivas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y una secuencia de transposón inactiva de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y luego reparando pequeños déficits de los dominios funcionales de la enzima transposasa. Cada aminoácido de la transposasa completa, llamada SB10, se determinó mediante una "secuencia consenso por la regla de la mayoría" basada en 12 genes parciales hallados en ocho especies de peces. Los primeros pasos fueron restituir una proteína completa mediante el rellenado de las brechas de la secuencia y revirtiendo los codones de terminación que evitarían la síntesis del putativo polipéptido de 360 aminoácidos. El siguiente paso fue revertir las mutaciones de la señal de localización nuclear (NLS) que se requiere para importar la enzima transposasa desde el citoplasma, en donde se la elabora, hacia el núcleo, en donde actúa. Se restituyó el extremo amino de la transposasa, que contiene los motivos de unión a ADN para el reconocimiento de las repeticiones directas (DR). Los últimos dos pasos restituyeron el dominio catalítico, el cual presenta aminoácidos conservados de ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) con un espaciado específico que se halló en integrasas y recombinasas. El resultado final fue la SB10, la cual contiene todos los motivos requeridos para su función.

65

La transposasa SB10 ha sido mejorada en la última década desde su construcción mediante el incremento del consenso con un mayor número de secuencias de transposones extintos y probando diversas combinaciones de cambios. Otro trabajo ha demostrado que el dominio de unión a ADN consiste en dos secuencias apareadas que son homólogas a los motivos de secuencia que se hallan en ciertos factores de transcripción. Los subdominios apareados de la transposasa SB se designaron como PAI y RED. El subdominio PAI tiene un rol importante en el reconocimiento de las secuencias de DR en el transposón. El subdominio RED se superpone con la señal de localización nuclear, pero su función permanece sin ser aclarada. La versión más reciente de la transposasa SB, la SB100X, tiene aproximadamente 100 veces más actividad que la SB10 determinado por ensayos de transposición de genes de resistencia a antibiótico llevados a cabo en células HeLa humanas en cultivo. La transposasa SB100x tiene nueve cambios de aminoácido en comparación con la SB10 (K14R, K33A, R1 15H, RKEN214-217DAVQ, M243H, T314N). The International Society for Molecular and Cell Biology and Biotechnology Protocols and Research (ISMCCBPR) nombró a la SB100X como la molécula del año en 2009 por el reconocimiento del potencial que tiene en la ingeniería genómica del futuro. El transposón reconocido por la transposasa SB se nombró T debido a que el mismo se aisló del genoma de otro salmónido, *Tanichthys albonubes*. El transposón consiste en una secuencia genética de interés que está flanqueada por repeticiones invertidas (IR) que en sí mismas contienen repeticiones directas cortas (DR) (puntas de flecha en tándem IR-DR). T tenía la secuencia de IR/DR más cercana a la secuencia consenso de los transposones extintos similares a Tc-1 en peces. El transposón consenso tiene IR de 231 pares de bases. Las DR más internas tienen 29 pares de bases de longitud mientras que las DR más externas tienen 31 pares de bases de longitud. La diferencia de longitud es crítica para las tasas de transposición máximas. El componente transposón T original del sistema de transposón SB ha sido mejorado mediante cambios menores para corresponderse con el consenso de muchos transposones relacionados extintos y activos.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la unidad de transposón de la presente invención tiene las características antes mencionadas.

A lo largo de la última década, los transposones SB se han desarrollado como vectores no virales para la introducción de genes en genomas de animales vertebrados y para terapia génica. La carga genética puede ser un casete de expresión, un transgén y elementos asociados que confieren la regulación transcripcional de la expresión a un nivel deseado en uno o más tejidos específicos. Un uso alternativo de los transposones SB es el descubrimiento de funciones de genes, especialmente aquellos que causan cáncer, mediante la administración de secuencias de ADN que trastornan al máximo la expresión de genes cercanos al sitio de inserción. Este proceso se denomina como mutagénesis por inserción o mutagénesis por transposones. Cuando un gen se inactiva por la inserción de un transposón (o por otro mecanismo), el gen es "noqueado". Se han elaborado ratones noqueados y ratas noqueadas con el sistema de SB.

Ya sea para la administración de genes o para la alteración de genes, los transposones SB combinan las ventajas de los virus y del ADN desnudo. Los virus se han seleccionado evolutivamente en base a sus capacidades para infectar y replicarse en nuevas células huéspedes. En forma simultánea, las células han evolucionado mecanismos moleculares principales de defensa para protegerlas contra las infecciones virales. Para algunas aplicaciones de ingeniería genómica tales como algunas formas de terapia génica, es también importante evitar el uso de virus por razones sociales y regulatorias. El uso de vectores no virales evita muchas, pero no todas, las defensas que las células emplean contra los vectores.

En la Figura 2 se muestra en forma esquemática la organización típica de un transposón SB.

Existe una diferencia entre los transposones *Sleeping Beauty* y otros miembros de la familia de transposones Tc1/mariner. Los transposones *Sleeping Beauty* contienen dos repeticiones directas (DR) dentro de cada repetición terminal invertida (ITR). La translocación del transposón *Sleeping Beauty* en general requiere la unión de la transposasa *Sleeping Beauty* a las ITR de aproximadamente 230 pb de longitud a ambos lados del transposón. Estas ITR típicamente contienen dos repeticiones directas imperfectas (DR) de aproximadamente 32 pb. Las repeticiones directas externas están en los extremos terminales del transposón mientras que las repeticiones directas internas se localizan dentro del transposón, típicamente a una distancia de entre 165 y 170 pb, preferiblemente 169 pb, por fuera de las repeticiones directas externas. Las diferencias entre las secuencias repetidas directas internas y externas parecen ser importantes y hasta ahora no existe ninguna evidencia de una secuencia repetida directa universal que funcione en cualquier posición, independientemente de si es Lo, Li, Ri o Ro. Típicamente, los transposones están flanqueados por pares de bases dinucleotídicas TA que parecen ser importantes para la escisión. El análisis mutacional dentro de las secuencias de las repeticiones directas imperfectas ha conducido a varios transposones SB con actividades de transposición significativamente mayores (Zayed, H., y col., Mol. Therap. 9:292-304 (2004)), tales como el "T2" que tiene secuencias repetidas directas consenso internas (Li y Ri) y externas (Lo y Ro) (véase la Figura 2) o desarrollos más recientes con mutaciones que actúan en forma sinérgica y resultan en un aumento de actividad de casi cuatro veces en comparación con la transposasa de tipo salvaje (Zayed, H., y col., Mol. Therap. 9:292-304 (2004)).

En el sistema de transposón SB como se usa la presente invención, en formas de realización preferidas, las correspondientes ITR tienen las siguientes secuencias:

Una ITR de la unidad de transposón es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes una o más secuencias denominadas "Lo" y "Li", respectivamente, como DR:

Lo: TA / CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACTTAAG (SEQ ID NO:4);  
 Li: TCCAGTGGGTCAGAAGTTTACATACTAAGT (SEQ ID NO:5).

5 Esta ITR de la unidad de transposón no se limita en forma particular a contener la o las secuencias específicas anteriores de la SEQ ID NO:4 y/o la SEQ ID NO:5 pero puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 4 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente. Como alternativa, esta ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 3 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente. Esta ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 2 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente. Más preferiblemente, esta ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta 1 sustitución en comparación con la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:5, respectivamente.

10 La ITR anterior de la unidad de transposón que tiene una o más de las sustituciones precedentes puede resultar en una ITR que tiene la misma capacidad, o una similar, de ser transpuesta por una transposasa SB como una ITR que contiene la SEQ ID NO:4 y/o la SEQ ID NO:5.

15 La otra ITR de la unidad de transposón preferiblemente puede ser una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes una o más secuencias denominadas "Ri" y "Ro", respectivamente, como DR:

20 Ri: CCCAGTG G GTCAG AAGTTTACATACTCAAT (SEQ ID NO:6);  
 Ro: TA / CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACCTTAG (SEQ ID NO:7).

25 Esta otra ITR de la unidad de transposón no se limita en forma particular a la o las secuencias específicas anteriores de la SEQ ID NO:6 y/o la SEQ ID NO:7 pero puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 4 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. Como alternativa, esta otra ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 3 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. Esta otra ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 2 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. Más preferiblemente, esta otra ITR de la unidad de transposón también puede comprender una DR que tiene una secuencia que muestra 1 sustitución en comparación con la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7, respectivamente. La ITR precedente de la unidad de transposón que tiene una o más de las sustituciones precedentes puede resultar en una ITR que tiene la misma capacidad o similar de ser transpuesta por una transposasa SB como una ITR que contiene la SEQ ID NO:6 y/o SEQ ID NO:7.

35 En una forma de realización preferida, en cada una de las ITR descritas precedentemente, las repeticiones directas externas (llamadas "Lo" y "Ro", respectivamente) están localizadas en los extremos terminales del transposón mientras que las repeticiones directas internas (llamadas "Li" y "Ri", respectivamente) están localizadas dentro del transposón. Preferiblemente, en cada una de las ITR descritas precedentemente, existe un espaciador de aproximadamente entre 165 y 170 pb, más preferiblemente de aproximadamente 169 pb, entre las repeticiones directas internas y externas.

40 En una forma de realización más preferida, por lo menos una de las ITR de la unidad de transposón es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes secuencias consenso llamadas "DRo" y "DRi", respectivamente, como una DR:

45 DRo (consenso): TA / CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACYTAAG (SEQ ID NO:8);  
 Dri (consenso): CAGTGGGTCAGAAGTTTACATACTMART (SEQ ID NO:9), en donde M puede ser A o C y R puede ser G o A.

50 Esta al menos una de las ITR de la unidad de transposón que es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes secuencias consenso llamadas "DRo" y "DRi", respectivamente, como una DR no se limita particularmente a la o las secuencias específicas precedentes de la SEQ ID NO:8 y/o la SEQ ID NO:9 pero también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 4 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, respectivamente. Como alternativa, esta secuencia consenso de la ITR de la unidad de transposón de la presente invención también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 3 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, respectivamente. Esta secuencia consenso de la ITR de la unidad de transposón de la presente invención también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta entre 1 y 2 sustituciones en comparación con la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, respectivamente. Más preferiblemente, la secuencia consenso de la ITR de la unidad de transposón de la presente invención también puede comprender una DR que tiene una secuencia que presenta 1 sustitución en comparación con la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, respectivamente.

60 La al menos una precedente de las ITR de la unidad de transposón que es una secuencia que comprende por lo menos una de las siguientes secuencias consenso llamadas "Dro" y "Dri", respectivamente, como una DR de la unidad de transposón que tiene una o más de las sustituciones precedentes puede resultar en una ITR que tiene la misma capacidad o similar de ser transpuesta por una transposasa SB como una ITR que contiene la SEQ ID NO:8 y/o la SEQ ID NO:9.

65

En una forma de realización preferida, dentro de la ITR descrita precedentemente, la repetición directa consenso externa (llamada "DRo") está localizada en el extremo terminal del transposón mientras que la repetición directa consenso interna (llamada "DRI") está localizada dentro del transposón. Preferiblemente, dentro de cada de estas ITR, existe un espaciador de aproximadamente entre 165 y 170 pb, más preferiblemente de aproximadamente 169 pb, entre la repetición directa consenso interna y externa.

En una forma de realización preferida, el sistema de transposón es un sistema SB y la transposasa codificada por el ARN del componente (b) es la transposasa SB hiperactiva SB100X que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 que ha sido descrita en Mathes y col., Nat. Genet. 41, 2009.

Tal como se mencionó precedentemente, los transposones son conocidos por integrarse en secuencias específicas, preferiblemente una secuencia TA. Esto también se aplica para el sistema transposasa SB/transposón de la presente invención. Además, en una forma de realización preferida, una transposasa SB integra el transposón en un sitio de integración que comprende la secuencia AYATATRT, en donde Y puede ser T o C y R puede ser G o A.

En otra forma de realización preferida, la transposasa es la transposasa SB hiperactiva SB100X que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 o una secuencia que es por lo menos 70% idéntica a SEQ ID NO:1 y que tiene una actividad transposasa que es por lo menos 80%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90% de la correspondiente a la transposasa SB100X que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, la transposasa es la transposasa SB hiperactiva SB100X que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 o una secuencia que es por lo menos n % idéntica a SEQ ID NO:1 en donde n es un entero entre 70 y 100, preferiblemente 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 y la transposasa que tiene una actividad transposasa que es por lo menos 80%, 85%, o 90% de la de dicha transposasa SB100X.

Respecto a la determinación de la identidad de secuencia, se debe aplicar lo siguiente: Cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia más larga o al porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia más larga que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia más corta. Preferiblemente, se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia más larga. El grado de identidad de secuencia puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en el estado de la técnica usando preferiblemente algoritmos de computadora adecuados tales como CLUSTAL.

Cuando se usa el método de análisis Clustal para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, por lo menos 70% idéntica a una secuencia de referencia puede usarse la configuración por defecto o la configuración son preferiblemente como a continuación: Matriz: blosum 30; Penalidad por no coincidencia: 10,0; Penalidad por no coincidencia extendida: 0,05; Retraso divergente: 40; Distancia de separación de no coincidencia: 8 para comparaciones de secuencias de aminoácidos. Para las comparaciones de secuencias nucleotídicas, la penalidad por no coincidencia prolongada preferiblemente se ajusta a 5,0.

En una forma de realización preferida se usa ClustalW2 para la comparación de secuencias de aminoácidos. En el caso de comparaciones/alineamientos de pares, se elige preferiblemente la siguiente configuración: Matriz de peso de proteína: BLOSUM 62; abertura de no coincidencia: 10; extensión de no coincidencia: 0,1. En el caso de múltiples comparaciones/alineamientos, preferiblemente se elige la siguiente configuración: Matriz de peso de proteína: BLOSUM 62; abertura de no coincidencia: 10; extensión de no coincidencia: 0,2; distancia de no coincidencia: 5; no coincidencia no terminal.

Preferiblemente, el grado de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia.

Los residuos de aminoácidos ubicados en una posición correspondiente a una posición como se indica en la presente más adelante en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 pueden ser identificados por la persona con experiencia mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, dichos residuos de aminoácidos pueden ser identificados por alineamiento de la secuencia en cuestión con la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:1 y mediante la identificación de las posiciones que corresponden a las posiciones indicadas precedentemente SEQ ID NO:1. El alineamiento puede hacerse con medios y métodos conocidos para la persona con experiencia, por ejemplo mediante el uso de un algoritmo de computadora conocido tal como el método Lipman-Pearson (Science 227 (1985), 1435) o el algoritmo CLUSTAL. Se prefiere que en tal alineamiento se asigne homología máxima a los residuos de aminoácidos conservados presentes en las secuencias de aminoácidos.

En una forma de realización preferida se usa ClustalW2 para la comparación de secuencias de aminoácidos. En el caso de comparaciones/alineamientos de a pares, preferiblemente se elige la siguiente configuración: Matriz de peso de proteína: BLOSUM 62; abertura de no coincidencia: 10; extensión de no coincidencia: 0,1. En el caso de múltiples comparaciones/alineamientos, preferiblemente se elige la siguiente configuración: Matriz de peso de proteína: BLOSUM 62; abertura de no coincidencia: 10; extensión de no coincidencia: 0,2; distancia de no coincidencia: 5; no coincidencia no terminal.

Preferiblemente, el grado de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia.

En otra forma de realización preferida, el sistema de transposón es un sistema SB y el ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma del componente (b) es un ARN que tiene la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:2 o 3.

5 En otra forma de realización preferida, el ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma del componente (b) es un ARN que tiene la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:2 o 3 o una secuencia que es por lo menos 60% idéntica a SEQ ID NO:2 o 3 y codifica para una transposasa que tiene una actividad transposasa que es por lo menos 80%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90% de la de una transposasa codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:2 o 3.

10 Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la presente invención, el ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma del componente (b) es un ARN que tiene la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:2 o 3 o una secuencia que es por lo menos n % idéntica a SEQ ID NO:2 o 3 en donde n es un entero entre 60 y 100, preferiblemente 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 y que codifica para una transposasa que tiene una actividad transposasa que es por lo menos 80%, 85%, o 90% de la de una transposasa codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:2 o 3.

Respecto a la determinación de la identidad de secuencia del polinucleótido, se aplica lo mismo que ha sido descrito precedentemente en el contexto de la determinación de la identidad de secuencia a nivel de la secuencia de aminoácidos.

20 Además, respecto a la combinación de nucleótidos modificados y no modificados, se aplica lo mismo al ARN que codifica para una transposasa que tiene la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:2 o 3 o una secuencia que es por lo menos 60% idéntica a SEQ ID NO:2 o 3 tal como se ha descrito precedentemente.

En una forma de realización preferida, la secuencia polinucleotídica del ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma del componente (b) es una secuencia con optimización de codones parcial o para la longitud completa. La optimización de codones es una técnica para maximizar la expresión de la proteína por aumento de la eficacia de traducción de un gen de interés. Es conocido que los genes naturales no usan los codones disponibles al azar, sino que muestran una determinada preferencia por codones particulares para el mismo aminoácido. Por lo tanto, debido a la degeneración del código genético – un aminoácido puede ser codificado por varios codones – se puede transformar la secuencia nucleotídica de un gen de interés en un conjunto de codones preferidos de la misma especie u otra. En el contexto de la invención, la secuencia con optimización de codones puede, por ejemplo, tener una optimización de codones para (la expresión en) vertebrados, preferiblemente para (la expresión en) mamíferos, más preferiblemente para (la expresión en) ratones o, incluso más preferiblemente, para (la expresión en) humanos. Los ejemplos particulares de secuencias nucleotídicas que codifican para dicha secuencia con optimización de codones se describen en las SEQ ID Nos:2 y 3.

También es posible, por supuesto, usar otra transposasa SB, por ejemplo, la transposasa SB "de tipo salvaje" o transposasas derivadas de la misma. La secuencia de aminoácidos de la transposasa SB canónica de tipo salvaje ha sido descrita por Ivics y col. (Cell 91, 1997); véase la Figura 2 de ese trabajo.

La actividad de transposasa de una dada transposasa SB modificada en comparación con la actividad transposasa de otra transposasa SB puede ser determinada por la persona con experiencia mediante métodos conocidos en el estado de la técnica y, en consecuencia, puede, por ejemplo, determinarse mediante ensayos de transposición de genes de resistencia a antibióticos realizados en células HeLa de humano cultivadas en tejido.

Tal como se mencionó precedentemente, la presente invención no se limita particularmente a una combinación de una unidad de transposón específica que contiene ITR o DTR particulares y una transposasa correspondiente. Puede usarse cualquier combinación de una unidad de transposón específica que contiene ITR o DTR particulares y su correspondiente transposasa. Muchas unidades de transposón específicas que contienen ITR o DTR particulares y sus correspondientes transposasas son conocidas en el estado de la técnica y pueden usarse de acuerdo con la presente invención. En consecuencia, en otra forma de realización, la unidad de transposón en un sistema de transposón de acuerdo con la presente invención preferiblemente se basa en un transposón PiggyBac (PB). Los transposones PiggyBac (PB) son conocidos en el estado de la técnica como un elemento genético móvil que se transpone de manera eficaz mediante un mecanismo de "corte y empalme" tal como ya se describió precedentemente. Durante la transposición, una transposasa PB reconoce secuencias de repeticiones terminales invertidas específicas de transposón (ITR) localizadas en ambos extremos del transposón y mueve los contenidos de los sitios originales y los integra de manera eficaz a los sitios TTAA del genoma.

En otra forma de realización, de acuerdo con lo precedente, la presente invención se relaciona con el uso del sistema de transposón precedente para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana. Los métodos para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana son conocidos en el estado de la técnica y, de acuerdo con la presente invención, consecuentemente pueden aplicarse. Los métodos para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana se revisan, por ejemplo, en Kim y Eberwine (Anal Bioanal Chem 397:3173-3178 (2010)).

En una forma de realización más preferida, la presente invención se relaciona con el uso del sistema de transposón precedente para la administración de genes a una célula diana, en donde la administración de genes se lleva a cabo

mediante electroporación. Incluso más preferido, en particular cuando, por ejemplo, se transfectan células madre hematopoyéticas, se usa el Electroporador Lonza para la administración de genes a una célula diana. El Electroporador Lonza provee una electroporación mejorada que usa la "Tecnología Nucleofector™" de Lonza.

5 En una forma de realización preferida, de acuerdo con lo precedente, la presente invención se relaciona con el uso del sistema de transposón precedente para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana, en donde la célula diana es una célula madre hematopoyética. Las células madre hematopoyéticas habitualmente derivan de la médula ósea, sangre periférica, o sangre de cordón umbilical. En consecuencia, en una forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con el uso del sistema de transposón precedente para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana, en donde la célula diana es una célula madre hematopoyética (HSC),  
10 en donde la HSC deriva de la médula ósea, sangre periférica, o sangre de cordón umbilical.

Las HSC son precursores de los linajes mielóide (por ejemplo, monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, células dendríticas, megacariocitos, plaquetas) y linfóide (células T, células B, células asesinas naturales) de las células sanguíneas. Respecto a las estrategias terapéuticas, de acuerdo con la presente invención, el sistema de transposón precedente puede ser usado para la administración de genes en una célula madre hematopoyética, en donde dicha HSC puede ser autóloga (es decir, se usan las propias células madre del paciente) o alogénica (es decir, las HSC provienen de un donante). Preferiblemente, el sistema de transposón precedente para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana, en donde la célula diana es una HSC, es útil para el trasplante de células madre hematopoyéticas. El trasplante de células madre hematopoyéticas con frecuencia se realiza en pacientes con determinados tipos de cánceres de origen sanguíneo o cánceres de  
15 médula ósea, tal como mieloma múltiple o leucemia.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con el uso del sistema de transposón precedente para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana, en donde la célula diana es una célula madre hematopoyética, en donde la célula madre hematopoyética, una vez que se ha introducido el sistema de transposón de la presente invención, se usa en terapia génica. De acuerdo con esta forma de realización, la presente invención se relaciona con un sistema de transposón para usar en terapia génica. La terapia génica con células madre hematopoyéticas (HSC) puede potencialmente curar una variedad de enfermedades hematopoyéticas (humanas). En consecuencia, en una forma de realización preferida, de acuerdo con la presente invención, la terapia génica se usa para tratar o prevenir enfermedades hematopoyéticas seleccionadas del grupo que consiste en inmunodeficiencias (preferiblemente, por ejemplo, SCID o ADA ligado al X), hemoglobinopatías (preferiblemente, por ejemplo, enfermedad de células falciformes o talasemia), otras enfermedades sanguíneas (preferiblemente, por ejemplo, deficiencia de adherencia de leucocitos, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Wiskott Aldrich o anemia de Fanconi), VIH o terapia génica de quimioresistencia (preferiblemente, por ejemplo, introducción de genes de resistencia tales como MGMT).  
25  
30  
35

En una forma de realización preferida, la célula madre hematopoyética es una célula CD34<sup>+</sup>.

La transferencia génica a células madre hematopoyéticas y células progenitoras ha sido descrita, por ejemplo, en Xue y col., Blood 1 14(7) 2009. La transferencia génica a células madre hematopoyéticas y células progenitoras tiene muchas aplicaciones y la terapia génica basada en células madre hematopoyéticas (HSC, en particular, apunta a una corrección genética a largo plazo y la reconstitución hematopoyética, y ha sido aplicada exitosamente en el contexto clínico para tratar una variedad de enfermedades monogénicas que incluyen inmunodeficiencias primarias (Mukherjee y Thrasher, 2013; Touzot y col., 2014).  
40

45 En otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con un método *ex vivo* para la administración de genes a una célula diana que comprende los siguientes pasos:

- (a) poner en contacto el sistema de transposón de la presente invención como se describe precedentemente en la presente con una célula;
- 50 (b) cultivar dicha célula en condiciones permisivas para el cultivo de dicha célula.

Preferiblemente, el sistema de transposón de la presente invención como se describe precedentemente en la presente se pone en contacto con una célula que se obtiene de un sujeto.

Preferiblemente, el sujeto es un mamífero tal como un perro, gato, cerdo, vaca, oveja, caballo, roedor, por ejemplo, rata, ratón, y cobayo, o un primate, por ejemplo, gorila, chimpancé y humano. En una forma de realización más preferible, el sujeto es un humano.  
55

En general, en los métodos de la presente invención, el sistema de transposón se introduce en una célula diana deseada. Este paso de introducción o de administración de los componentes del sistema de transposón a una célula se lleva a cabo mediante técnicas de administración/introducción estándares. Estas técnicas de administración/introducción son conocidas en el estado de la técnica y pueden ser realizadas, por ejemplo, como se describe en los ejemplos anexos mediante métodos de transfección conocidos en el estado de la técnica. Estas técnicas estándares han sido descritas, por ejemplo, en WO2011/012316 y, por ejemplo, en Kim y Eberwine (Anal Bioanal Chem. 397(8):3173-8 (2010)). En WO2011/012316 se describe, por ejemplo, un método para la transfección de células pulmonares con ARNm usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). En Kim y Eberwine se resumen las tres  
60  
65

clases principales de transfección que se usan ampliamente para administrar ácidos nucleicos a células, es decir, métodos de transfección biológicos, químicos y físicos.

Una vez que se ha introducido el sistema de transposón en las células diana la secuencia de interés se inserta en el genoma de la célula diana como se describe precedentemente en la presente. Posteriormente, como se describe en el paso precedente (b), dicha célula se cultiva en condiciones permisivas para el cultivo de dicha célula como se describe con mayor detalle más adelante.

Preferiblemente, después del paso (a) en donde el sistema de transposón de la presente invención como se describe precedentemente en la presente es puesto en contacto con una célula y antes del paso de cultivo (b), el método de la presente invención además puede comprender un paso de selección en donde se seleccionan y/o se purifican las células que tienen insertada la secuencia de interés en el genoma de la célula diana. Esto puede ser realizado, por ejemplo, mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante la utilización de genes o marcadores reporteros que permiten la detección de aquellas células que han integrado el transposón (que portan la secuencia de interés a insertar en el genoma y además una secuencia que codifica para un gen o marcador reportero). Posteriormente, en otra forma de realización, los métodos pueden comprender el cultivo de las células seleccionadas en un medio de expansión en condiciones permisivas para el cultivo de dichas células.

En general, en el método de acuerdo con la invención, las células pueden ser cultivadas en condiciones permisivas para el cultivo de la célula diana usada en el método de administración de genes. Las condiciones de cultivo de acuerdo con la presente invención se definirán de manera apropiada dependiendo del medio y células usadas/producidas. El medio de acuerdo con determinados aspectos de la presente invención puede ser preparado utilizando un medio usado para el cultivo de células animales como su medio basal, tal como cualquiera de TeSR, BME, BGJb, CMRL 1066, Glasgow MEM, Improved MEM Zinc Option, IMDM, Medio 199, Eagle MEM, MEM, DMEM, Ham, RPMI 1640, y medio Fischer, así como cualquier combinación de los mismos, pero el medio particularmente no se limita a los mismos con la condición de que pueda usarse para el cultivo de células animales. El medio para el cultivo de dichas células en condiciones permisivas para el cultivo de dichas células de acuerdo con la presente invención puede ser un medio que contiene suero o libre de suero. El medio libre de suero se refiere a un medio sin suero sin procesar o no purificado, y en consecuencia puede incluir medios con componentes derivados de la sangre purificados o componentes derivados de tejido animal (tal como factores de crecimiento). Respecto a la prevención de la contaminación con componentes derivados de animal heterogéneos, el suero puede derivar del mismo animal que el de la o las células madre. El medio para el cultivo de dichas células en condiciones permisivas para el cultivo de dichas células de acuerdo con la presente invención puede contener o puede no contener cualquier alternativa al suero. Las alternativas al suero pueden incluir materiales que contienen de manera apropiada albúmina (tal como albúmina rica en lípidos, sustitutos de albúmina tal como albúmina recombinante, almidón vegetal, dextranos e hidrolizados de proteínas), transferrina (u otros transportadores de hierro), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, elementos traza, 2-mercaptoetanol, 3'-tioglicerol, o equivalentes de los mismos. Las alternativas al suero pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en la Publicación Internacional No. 98/30679, por ejemplo. Como alternativa, puede usarse cualquier material disponible comercialmente para mayor conveniencia. Los materiales disponibles comercialmente incluyen reemplazo por suero con noqueo (KSR), concentrado de lípidos definidos químicamente (Gibco), y Glutamax (Gibco).

El medio para el cultivo de dichas células en condiciones permisivas para el cultivo de dichas células iNP también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (tales como aminoácidos no esenciales), vitamina(s), factores de crecimiento, citoquinas, sustancias antioxidantes, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agentes amortiguadores, y sales inorgánicas. La concentración de 2-mercaptoetanol puede ser, por ejemplo, aproximadamente entre 0,05 y 1,0 mM, y particularmente aproximadamente entre 0,1 y 0,5 mM, pero la concentración particularmente no se limita a las mismas con la condición de que sea apropiada para el cultivo de la o las células madre.

El cultivo de las células en condiciones permisivas para el cultivo de dichas células puede realizarse en un recipiente para cultivo, pero no se limita particularmente a: frasco, frasco para el cultivo de tejido, disco, disco de Petri, disco para el cultivo de tejido, multidisco, microplaca, placa de micropocillos, multiplaca, placa multipocillos, microportaobjetos, portaobjetos con cámara, tubo, bandeja, cámaras CellSTACK®, bolsa de cultivo, y botella rotatorias, con la condición de que tenga sea útil para cultivar las células dentro del mismo. Las células pueden ser cultivadas en un volumen de por lo menos o aproximadamente 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, 550 ml, 600 ml, 800 ml, 1000 ml, 1500 ml, o cualquier rango que derive de los mismos, dependiendo de las necesidades del cultivo. En una determinada forma de realización, el recipiente de puede ser un biorreactor, el cual puede referirse a cualquier dispositivo o sistema que soporte un ambiente biológicamente activo. El biorreactor puede tener un volumen de por lo menos o aproximadamente 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500 litros, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 metros cúbicos, o cualquier rango que derive de los mismos. El recipiente de cultivo puede ser adhesivo o no adhesivo para células y seleccionarse dependiendo del propósito. El recipiente de cultivo adhesivo para células puede estar recubierto con cualquier sustancia para la adhesión celular tal como una matriz extracelular (ECM) para mejorar la adhesividad de la superficie del recipiente a las células. El sustrato para la adhesión de las células puede ser cualquier material para unir las células o células alimentadoras (si se usan). El sustrato para la adhesión de las células incluye colágeno, gelatina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, vitronectina, laminina, y fibronectina y mezclas de los mismos, por ejemplo, Matrigel™, y preparaciones de membrana de células lisadas.

Pueden definirse de manera apropiada otras condiciones de cultivo. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser aproximadamente entre 30 y 40°C, por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39°C pero particularmente no se limita a ellas. La concentración de CO<sub>2</sub> puede ser de aproximadamente entre 1 y 10%, por ejemplo, aproximadamente entre 2 y 5%, o cualquier rango que puede derivar de esas. La tensión de

oxígeno puede ser de por lo menos o aproximadamente 1, 5, 8, 10, 20%, o cualquier rango que puede derivar de esas.

El cultivo de las células somáticas en condiciones permisivas para el cultivo de dichas células puede ser un cultivo de adhesión. En este caso, las células pueden cultivarse en presencia de células alimentadoras. En el caso que se usen células alimentadoras en los métodos de la presente invención, pueden usarse celular de estroma tales como fibroblastos fetales como células alimentadoras (por ejemplo, referirse a; Hogan y col, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994); Gene Targeting, A Practical Approach (1993); Martin (1981 ); Evans y Kaufman (1981 ); Jainchill y col, (1969); Nakano y col. (1996); Kodama y col. (1982); y Publicaciones Internacionales Nos. 01/088100 y 2005/080554).

Las células en condiciones permisivas para el cultivo de dichas células también pueden cultivarse en un cultivo en suspensión, que incluye cultivo en suspensión en transportadores o encapsulación en gel/biopolímero. El término cultivo en suspensión de las células se refiere a que las células se cultivan en condiciones no adherentes respecto al recipiente de cultivo o células alimentadoras (si se usan) en un medio.

En un paso posterior, una vez que se han cultivado las células (*ex vivo*) y proliferado, las células producidas de esta manera habiendo integrado la secuencia de interés en su genoma, pueden introducirse nuevamente de manera opcional en el sujeto del cual derivan o en otro sujeto. En consecuencia, el sistema de transposón de la presente invención puede ser usado beneficiosamente en estrategias de terapia génica como se describe en la presente adicionalmente más adelante con mayor detalle.

El sistema de transposón tal como se define precedentemente es particularmente útil en condiciones de medicina y en el tratamiento de una determinada enfermedad y, en particular, en terapia génica. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende el sistema de transposón de acuerdo con lo precedente.

El término "tratamiento" y similares se usan en la presente para referirse en general a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. En consecuencia, el tratamiento de la presente invención puede relacionarse con el tratamiento de estados (agudos) de una determinada enfermedad, pero también puede relacionarse con el tratamiento profiláctico en términos de prevenir totalmente o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma. Preferiblemente, el término "tratamiento" se debe comprender como que es terapéutico en términos de curar de manera parcial o completa una enfermedad y/o efectos adversos y/o síntomas atribuidos a la enfermedad. "Agudo" en este sentido se refiere a que el sujeto muestra síntomas de la enfermedad. En otras palabras, el sujeto a tratar se encuentra con necesidad actual de un tratamiento y el término "tratamiento agudo" en el contexto de la presente invención se relaciona con las medidas tomadas para tratar de manera apropiada la enfermedad después del inicio de la enfermedad o la aparición de la enfermedad. El tratamiento también puede ser un tratamiento profiláctico o preventivo, es decir, medidas tomadas para la prevención de la enfermedad, por ejemplo, con el objetivo de prevenir la infección y/o el inicio de la enfermedad.

La composición farmacéutica de la presente invención también puede administrarse a través de un gran rango de clases de formas de administración conocidas para la persona con experiencia. La administración puede ser de manera sistemática, local, oral, mediante aerosoles que incluyen pero no se limita a comprimidos, inyección con agujas, el uso de inhaladores, cremas, espumas, geles, lociones y ungüentos.

Tal como se mencionó, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica, que comprenden una cantidad eficaz del sistema de transposasa de la presente invención de acuerdo con lo precedente y por lo menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un excipiente o vehículo es una sustancia inactiva junto con el ingrediente activo, es decir, construcción de la presente invención de acuerdo con lo precedente, con el propósito de aumentar el volumen de las formulaciones que contengan ingredientes activos potentes. Los excipientes con frecuencia son referidos como "agentes espesantes", "rellenos", o "diluyentes". El aumento de volumen permite la administración conveniente y precisa de una sustancia farmacológica cuando se produce una forma de dosificación. También pueden servir para diferentes propósitos de mejora terapéutica, tal como la facilitación de la absorción o solubilidad de fármacos, u otras consideraciones farmacocinéticas. Los excipientes también pueden ser útiles en el proceso de elaboración, para ayudar al manejo de la sustancia activa referida de manera de facilitar la fluidez del polvo o propiedades antiadherentes, además de ayudar a la estabilidad *in vitro* tal como la prevención de la desnaturalización durante la vida útil esperada. La selección de los excipientes apropiados también depende de la ruta de administración y la forma de dosificación, así como el ingrediente activo y otros factores.

Por lo tanto, en línea con lo precedente, la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del sistema de transposasa de la presente invención puede ser una forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otras, en una forma de uno o más polvos, uno o más comprimidos, una o más soluciones o uno o más aerosoles. Se prefiere que dicha composición farmacéutica opcionalmente comprenda un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados, excipientes y/o diluyentes son bien conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden ser formuladas mediante métodos convencionales conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada, es decir, en “una cantidad eficaz” que puede ser determinada fácilmente por la persona con experiencia mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. El régimen de dosificación será determinado por el médico y factores clínicos. Tal como es bien conocido en las artes de la medicina, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente o sujeto, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular a administrar, género, tiempo y ruta de administración, salud general, y otros fármacos que se están administrando concurrentemente.

Por lo tanto, preferiblemente, el sistema de transposón de la presente invención está incluido en una cantidad eficaz. El término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para inducir una respuesta terapéutica detectable en el sujeto al cual se administra la composición farmacéutica. De acuerdo con lo precedente, el contenido de la construcción de la presente invención en la composición farmacéutica no se limita a ser útil para el tratamiento como se describió precedentemente, sino que preferiblemente contiene entre 0,0000001 y 10% en peso por composición total. Además, la construcción descrita en la presente preferiblemente se emplea en un vehículo. En general, una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable se usa en el vehículo para volver isotónica a la composición. Los ejemplos del vehículo incluyen a título enunciativo no taxativo, solución de Ringer y solución de dextrosa. Preferiblemente, los excipientes, vehículos, o estabilizadores aceptables son no tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas, incluyendo soluciones amortiguadoras tales como citrato, fosfato, y otros ácidos orgánicos; contraiones formadores de sales, por ejemplo sodio y potasio; polipéptidos de peso molecular bajo (> 10 residuos de aminoácidos); proteínas, por ejemplo albúmina sérica, o gelatina; polímeros hidrofílicos, por ejemplo polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como histidina, glutamina, lisina, asparagina, arginina, o glicina; hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; monosacáridos; disacáridos; otros azúcares, por ejemplo sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; agentes quelantes, por ejemplo EDTA; tensioactivos no iónicos, por ejemplo Tween, Pluronic o polietilenglicol; antioxidantes que incluyen metionina, ácido ascórbico y tocoferol; y/o conservantes, por ejemplo cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, por ejemplo metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol). Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen con mayor detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ta ed., 1985, Mack Publishing Co.

El progreso terapéutico puede ser monitoreado mediante evaluación periódica. El sistema de transposón de la presente invención o la composición farmacéutica de la invención puede estar en solución acuosa o no acuosa estéril, suspensiones, y emulsiones, así como cremas y supositorios. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medio salino y amortiguado. También puede haber presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otros agentes dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Dichos agentes pueden ser, por ejemplo, polioxietilensorbitan monolaurato, disponible en el mercado con el nombre comercial Tween, propilenglicol, EDTA, Citrato, Sacarosa, así como otros agentes que sean adecuados para el uso pretendido de la composición farmacéutica que son bien conocidos para la persona con experiencia en el estado de la técnica.

De acuerdo con esta invención, el término “composición farmacéutica” se relaciona con una composición para la administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser para el uso en terapia génica. Tal como se mencionó precedentemente, el sistema de transposón de la presente invención, más específicamente la unidad de transposón que comprende una “secuencia de interés” puede ser usada, por ejemplo, en terapias génicas en donde la “secuencia de interés” codifica para un polipéptido o proteína terapéutica o farmacéuticamente activa que tiene un efecto terapéutico o preventivo. Por lo tanto, en formas de realización preferidas, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para el uso en terapia génica en el tratamiento o prevención de una enfermedad tal como se indica en la **Tabla 1** precedente. En consecuencia, las terapias génicas de acuerdo con la presente invención pueden ser para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad como se indica en la **Tabla 1** precedente.

Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para usar en terapia génica en casos en los que los defectos genéticos descritos en la **Tabla 1** precedente llevan a una enfermedad que puede ser tratada o prevenida mediante una terapia de reemplazo de transcritos/terapia de reemplazo de enzima con la unidad de transposón de la presente invención, en donde la unidad de transposón comprende una “secuencia de interés” que codifica para una versión intacta de la proteína o un fragmento funcional de la misma que compensa el gen defectuoso descrito. En formas de realización particularmente preferidas, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para usar en terapias génicas en el tratamiento o prevención de enfermedades lisosomales como la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, MPS I, MPS II (síndrome de Hunter), MPS VI y

enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno tales como por ejemplo enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I (enfermedad de von Giercke), tipo II (enfermedad de Pompe), tipo III (enfermedad de Cori, tipo IV (enfermedad de Andersen), tipo V (enfermedad de McArdle, tipo VI (enfermedad de Hers), tipo VII (enfermedad de Tauri), tipo VII, tipo IX, tipo X, tipo XI (síndrome de Fanconi-Bickel), tipo XI, o tipo 0.

5 En otras formas de realización preferidas, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para usar en terapias génicas de acuerdo con la presente invención en donde la "región codificante que codifica para un polipéptido" codifica para un polipéptido terapéutica o farmacéuticamente activo, proteína o péptido que tiene un efecto terapéutico o preventivo, en donde dicho polipéptido, proteína o péptido se selecciona del grupo que codifica para los genes descritos en la **Tabla 1**.

10 En otras formas de realización preferidas, las terapias génicas de acuerdo con la presente invención pueden ser para usar en el tratamiento de cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección viral, una disfunción inmunológica, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno neurológico, trastornos metabólicos hereditarios o un trastorno genético o cualquier enfermedad en la cual una proteína o fragmento de proteína producido en una célula puede tener un efecto beneficioso para el paciente. Los ejemplos de cáncer incluyen cáncer de cabeza y cuello, 15 cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer anal, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de apéndice, cáncer de ojo, cáncer gástrico, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer pancreático, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de endometrio, cáncer cardiaco y sarcoma.

20 Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares incluyen aterosclerosis, enfermedad coronaria, enfermedad cardiopulmonar y cardiomiopatía.

Los ejemplos de disfunciones inmunológicas y enfermedades autoinmunitarias incluyen, a título enunciativo no taxativo, enfermedades reumáticas, esclerosis múltiple y asma.

25 Los ejemplos de infecciones virales incluyen, a título enunciativo no taxativo, infecciones con el virus de inmunodeficiencia humana, virus de herpes simple, papilomavirus humano, así como virus de hepatitis B y C.

Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, a título enunciativo no taxativo, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, y demencia.

30 Los ejemplos de trastornos metabólicos hereditarios incluyen, a título enunciativo no taxativo, enfermedad de Gaucher y fenilcetonuria.

En consecuencia, de acuerdo con lo precedente, el sistema de transposón como se describe precedentemente en la presente es para usar en terapia génica.

35 En una forma de realización preferida, de acuerdo con lo precedente, la terapia génica se usa para tratar o prevenir enfermedades hematopoyéticas seleccionadas del grupo que consiste en inmunodeficiencias (preferiblemente, por ejemplo, SCID o ADA ligado al X), hemoglobinopatías (preferiblemente, por ejemplo, enfermedad de células falciformes o talasemia), otras enfermedades sanguíneas (preferiblemente, por ejemplo, deficiencia de adherencia 40 de leucocitos, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Wiskott Aldrich o anemia de Fanconi), VIH o terapia génica de quimioresistencia (preferiblemente, por ejemplo, introducción de genes de resistencia tal como MGMT).

45 En consecuencia, de acuerdo con lo precedente, el sistema de transposón puede usarse directamente en la forma de una composición farmacéutica para administrar una secuencia de interés en el genoma de una determinada célula diana. Como alternativa, el sistema de transposón puede usarse para administrar una secuencia de interés en el genoma de una determinada célula diana *ex vivo* (en donde la célula diana se obtiene de un sujeto) mientras que la célula diana obtenida de esta manera, una vez que se integró el transposón en su genoma, puede ser introducida nuevamente en el sujeto o en otro sujeto.

50 La invención también se relaciona con un método de terapia génica. Por lo tanto, la presente invención se relaciona con un método para el tratamiento de una enfermedad tal como cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección viral, una disfunción inmunológica, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno neurológico, trastornos metabólico hereditario o un trastorno genético mediante una terapia génica. En cuanto a las formas de realización preferidas del método para el tratamiento se aplica lo mismo, *mutatis mutandis*, que se ha descrito precedentemente 55 en el contexto del sistema de transposón o la composición farmacéutica que comprende el sistema de transposón de la presente invención como se definió precedentemente.

60 En la presente invención, el sujeto es, en una forma de realización preferida, un mamífero tal como un perro, gato, cerdo, vaca, oveja, caballo, roedor, por ejemplo, rata, ratón, y cobayo, o un primate, por ejemplo, gorila, chimpancé, y humano. En una forma de realización más preferible, el sujeto es un humano.

La presente invención también se relaciona con un kit que comprende

65 (a) una unidad de transposón que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) o DTR que flanquean una secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana; y

(b) un ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma;

en donde dicho ARN que codifica para dicha transposasa se caracteriza porque contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados.

En cuanto a las formas de realización preferidas, se aplica lo mismo, *mutatis mutandis*, que se ha descrito precedentemente en el contexto el sistema de transposón de acuerdo con la presente invención. Ventajosamente, el kit de la presente invención además comprende, opcionalmente una o más soluciones amortiguadoras, soluciones de almacenamiento y/o reactivos remanentes o materiales requeridos para llevar a cabo los usos y métodos precedentes y de más adelante. Además, las partes del kit de la invención pueden ser envasadas en viales o frascos o en combinación en recipientes o unidades multicontenedores. El kit de la presente invención puede usarse ventajosamente, entre otros, para llevar a cabo los métodos de la invención, la preparación del sistema de transposón de la invención y podría emplearse en una variedad de aplicaciones referidas en la presente, por ejemplo, en los usos como se describe precedentemente y más adelante. Otro componente que puede incluirse en el kit son las instrucciones para una persona que utiliza el kit para su uso. La elaboración de los kits se realiza preferiblemente de acuerdo con procedimientos estándares que son conocidos para la persona con experiencia en el estado de la técnica.

Finalmente, la presente invención también se relaciona con una molécula de ARN que codifica para una transposasa, en donde dicho ARN que codifica para dicha transposasa se caracteriza porque contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados. En cuanto a las formas de realización preferidas de dicho ARN que codifica para dicha transposasa, se aplica lo mismo, *mutatis mutandis*, que se ha descrito precedentemente.

En este contexto, la presente invención también se relaciona con el uso de una molécula de ARN que codifica para la transposasa para la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana en donde dicho molécula de ARN que codifica para la transposasa se caracteriza porque contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados. En cuanto a las formas de realización preferidas del uso, se aplica lo mismo, *mutatis mutandis*, que se ha descrito precedentemente en el contexto de la molécula de ARN y la administración de genes *ex vivo* o *in vivo* a una célula diana de la presente invención.

**Figura 1: Complemento de la plataforma de ADN minicircular para la administración del transposón SB con la tecnología SNIM.RNA para la administración de la transposasa SB100X en HSC CD34+ de humano *in vitro*.**

(A) Titulación del sistema de transposón SB y análisis comprensivo de las eficacias de administración estable de genes obtenidas en células hCD34<sup>+</sup> usando tres formas diferentes de administración del sistema: ADN plasmídico solo, ADN minicircular solo o combinación de ADN minicircular/SNIM.RNA. La plataforma de ADN minicircular sola o combinada con la tecnología SNIM.RNA para la administración de la transposasa SB100X supera a la plataforma convencional de ADN plasmídico en términos de administración transitoria de ambos componentes del sistema SB (n= 4-8 por grupo). (B) las tasas de transposición de SB y la eficacia de la integración genómica mediada por SB fueron mejoradas de gran manera, cuando el sistema se introdujo mediante las plataformas de administración de ADN minicircular y ADN minicircular/SNIM.RNA. La eficacia de administración estable de genes se representa con el porcentaje de células positivas para Venus obtenidas en el día 14 luego de la nucleofección (n= 3-8 por grupo), y por el número de copias de vectores promedio (VCN) de los integrantes Venus (n= 3-7 por grupo) determinado para la población celular en total. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM. Correlación entre el VCN promedio determinado por PCR en tiempo real cuantitativa y MFI de las células que expresan Venus estimado mediante análisis por FACS después de 2 semanas de la expansión celular. MC, minicircular; MFI, intensidad de fluorescencia promedio; p, plásmido; SB, Sleeping Beauty; SNIM.RNA, ARN mensajero no inmunogénico estabilizado; tr-on, transposón; tr-se, transposasa; VCN, número de copia de vectores.

**Figura 2: Presentación esquemática de la organización de las ITR de un transposón SB típico.**

**Figura 3: Toxicidad de la administración génica 2 días luego de la nucleofección.**

(A) veces de cambio en el porcentaje de células negativas para TB determinado por el ensayo de exclusión de TB.  
(B) Veces de cambio en el porcentaje de células negativas para DAPI determinado por análisis por FACS.

Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM; n=5-6 por grupo; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01. TB, azul de tripán; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol.

**Figura 4: Eficacia de administración transitoria de genes.**

(A) Porcentaje (barras grises) e intensidad de fluorescencia media (MFI) (barras negras) de células positivas para Venus determinado por análisis por FACS después de 2 días luego de la administración.

(B) Eficacia relativa de la administración transitoria de genes calculada por multiplicación del porcentaje de células positivas para Venus y su MFI. Los datos se expresan como media  $\pm$  ESM; n=5-6 por grupo. \*\*, p<0,01.

5 **Figura 5: Eficacia de administración estable de genes.**

(A) Porcentaje (barras grises) e intensidad de fluorescencia promedio (MFI) (barras negras) de células positivas para Venus determinado mediante análisis por FACS después de 14/15 días luego de la administración.

10 (B) Eficacia relativa de la administración estable de genes calculada por multiplicación del porcentaje de células positivas para Venus y su MFI. C. Eficacia de transposición determinada mediante el porcentaje de células Venus<sup>+</sup> al día 14/15 que retuvieron la expresión de Venus a partir del día 2. Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM; n=5-6 por grupo. \*\*, p<0,01.

15 **Figura 6: Potencial de diferenciación de HSC de humano modificadas con SB y eficacia de transferencia estable de genes determinada mediante el ensayo de CFU.** Se usó el medio de metilcelulosa enriquecido con una mezcla de citoquinas que potencian la formación de unidades formadoras de colonias eritroides en ramillete (BFU-E), unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU- GM), y unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritroides, macrófagos y megacariocitos (CFU-GEMM). Se muestra el porcentaje de CFU que expresan Venus de manera estable después de la administración basada en ADN minicircular solo y ADN minicircular/SNIM.RNA del sistema de transposón SB. Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM; n=3 por grupo.

25 **Figura 7: (A)** Determinación del número de copias del vector (VCN) en todas las células. Los datos se expresan como medias  $\pm$  SEM; n=5-6 por grupo.

(B) Correlación entre el VCN determinado en todas las células y la eficacia relativa de administración estable de genes.

(C) VCN determinado en las CFU.

30 En los siguientes ejemplos se describirán otros aspectos y ventajas de la invención, los cuales se brindan con el propósito de ilustración y no a modo de limitación. Cada publicación, patente, solicitud de patente u otro documento citado en esta solicitud se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

## 35 Ejemplos

### Métodos

40 Las construcciones para la transfección se prepararon de acuerdo con procedimientos estándar. Las células se transfectaron como se describe en Xue y col., (*Blood* 114(7) 2009) y se utilizaron las mismas células. Se clonó la variante de SB hiperactiva SB100 en el pVAXA120. El plásmido resultante pVAXA120-SB100XmCo se linealizó con NotI y se usó para la producción del ARN SNIM de acuerdo con procedimientos estándar.

45 Como control negativo se clonó un mutante de SB100X no funcional en los sitios BamHI-EcoRI del pVAXA120. El plásmido resultante pVAXA120-SB100XmCo(DAE) se linealizó con NotI y se usó para la producción del ARN SNIM de acuerdo con procedimientos estándar.

El vector pVAXA120 ya se ha publicado con anterioridad (Kormann y col., 2011). Es esencialmente el mismo que el pVAXI (Life Technologies) con una extensión de 120 adeninas (A120) clonada entre sitios PstI-NotI.

50 Secuencia del ARN SB100XmCo SNIM resultante de la transcripción *in vitro* a partir del pVAXA120-SB100XmCo

```
GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAAGCUUGGUACCGAGCUCGGAUCCACCAUGGGCAAGAGCA
AAGAGAUCAGCCAGGACCUAGAGAAAGCGGAUCGUGGACCUGCACAAGAGCGGCUCUAGCCUGGGCGCCAUC
AGCAAGAGACUGGCCGUGCCUAGAAGCAGCGUGCAGACCAUCGUGCGGAAGUACAAGCACCACGGCACCAC
55 CCAGCCCAGCUACAGAUCUGGGAGAAGAAGAGUGCUGAGCCCCAGGGACGAGAGAACCUCUGUGCGCAAGG
UGCAGAUAACCCCAAGACCACCGCCAAGGACCUCUGAAGAUGCUGGAAGAGACAGGACCAAGGUGUGUCA
UCAGCACCGUGAAGAGGGUGCUGUACAGACACAACCUGAAGGGCCACAGCGCCAGAAAGAAGCCCUAGCUG
CAGAACAGGCACAAGAAGGCCAGACUGAGAUUCGCCACCGCCACGGCGACAAGGACAGAACCUUUUGGAGA
AACGUGCUGUGGAGCGACGAGACAAAGAUCGAGCUGUUCGGCCACAACGACCACAGAUACGUGUGGCGGAA
60 GAAGGGCGAGGCCUGCAAGCCCAAGAACACCAUCCUACCGUGAAGCACGGCGGAGGCAGCAUCAUGCUGU
GGGGCUGUUUUGCCGUGGCCGGCACAGGCCGCCUGCAUAAGAUCGACGGCAUCAUGGACGCCGUGCAGUA
CGUGGACAUCCUGAAGCAGCACCUGAAAACCUUGUGCGGAAGCUGAAGCUGGGCAGAAAUGGGUGUUC
AGCACGACAACGACCCCAAGCACACCAGCAAGGUGGUGGCAAGUGGCUGAAGGACAACAAGUGAAAGUGC
UGGAAUGGCCAGCCAGACCCCGACCUGAACCCTCAGAACCCUGAAGCUGGAGCCGAGCUGAAGAAAAGAGUG
65 CGGGCCAGAAGGCCACCAACCUGACACAGCUGCACCAGCUGUGCCAGGAAGAGUGGGCCAAGAUCCACCC
CAACUACUGCGGCAAGCUGGUGGAAGGCUACCCCAAGAGGCUGACCCAAGUGAAGCAGUUCAAGGGCAACG
```

CCACCAAGUACUGAGAAUUCUGCAGAAA  
AAAGCGGCC;  
(SEQ ID N°: 2).

5 Secuencia del ARN SB100XmCo(DAE) SNIM resultante de la transcripción *in vitro* a partir del pVAXA120-SB100XmCo(DAE)

GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAACUUUAAGCUUUGGUACCGAGCUCGGAUCCACCAUGGGCAAGAGCA  
AAGAGAUACAGCCAGGACCUAGAGAAAGCGGAUCGUGGACCUGCACAAGAGCGGCUCUAGCCUGGGCGCCAUC  
10 AGCAAGAGACUGGCCUGCCUAGAAGCAGCGUGCAGACCAUCGUGCGGAAGUACAAGCACCACGGCACCAC  
CCAGCCAGCUACAGAUUCUGGAGAGAAAGAGUGCUGAGCCCCAGGGACGAGAGAACCCUCGUGCGCAAGG  
UGCAGAUCAACCCAGAACCACCGCCAAGGACCUCGUGAAGAUUGCUUGAAGAGACAGGCACCAAGGUGUCCA  
UCAGCACCGUGAAGAGGGUGUCUGUACAGACACAACCUAGAAGGGCCACAGCGCCAGAAAGAAGCCCCUGCUG  
CAGAACAGGCACAAGAAGGCCAGACUGAGAUUCGCCACCGCCCACGGCGACAAGGACAGAACCUUUUGGAGA  
15 AACGUGCUGUGGAGCGACGAGACAAAGAUUCGAGCUGUUCGGCCACAACGACCACAGAUACGUGUGGGCGGAA  
GAAGGGCGAGGGCCUGCAAGCCCCAAGAACCACCAUCCUACCGUGAAGCACGGCGGAGGCAGCAUCAUGCUGU  
GGGGCUGUUUUGCCGUGGCCGACAGGCCCGCCUGCAUAGAUCGACGGCAUCAUGGACGCCCUGCAGUA  
CGUGGACAUCCUGAAGCAGCACCUGAAAACCUUCUGUGCGGAAGCUGAAGCUGGGCAGAAAUGGGUGUUC  
20 AGCACGCCAACGACCCCAAGCACACCAGCAAGGUGGUGGCAAGUGGCUAAGGACAACAAAGUGAAAGUGC  
UGGAAUGGCCAGCCAGAGCCCCGACCUGAACCCCAUCGAGAACCUGUGGGCCGAGCUGAAGAAAAGAGUG  
CGGCACAGAAGGCCACCAACCUAGCACGUGCAGCCAGCUGCGGAAAGAGUGGCAAGAUCCAGCACACC  
CAACUACUGCGGCAAGCUGGUGGAAGGCUACCCCAAGAGCUGACCCCAAGUGAAGCAGUCCAAGGGCAACG  
25 CCACCAAGUACUGAGAAUUCUGCAGAAA  
AAAGCGGCC;(S  
EQ ID N°: 3).

Los ARN transcritos se modifican químicamente de modo tal que aproximadamente un 25% de los residuos uridina es 2-tiouridina (s2U) y aproximadamente un 25% de los residuos citidina es 5-metilcitidina (m5C). Esto se logra mediante el uso de los porcentajes correspondientes de la reacción de transcripción (es decir, un 25%) de los ribonucleótidos modificados.

#### Purificación y cultivo de células hCD34<sup>+</sup>.

Se purificaron células hCD34<sup>+</sup> a partir de los productos de aféresis recolectados después de la movilización de células madre de sangre periférica inducida mediante inyecciones del factor estimulante de colonias de granulocitos. Los productos de aféresis se obtuvieron de tres donantes sanos independientes después de firmar el consentimiento informado. La cosecha de la aféresis fue sometida primero a lisis de glóbulos rojos usando solución amortiguadora ACK (Invitrogen) y luego a una selección positiva mediante separación celular magnética usando el kit MACS human CD34 MicroBead, el separador MACS y columnas MACS LS (Miltenyl Biotec) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Antes de la nucleofección, las células hCD34<sup>+</sup> fueron preestimuladas durante 1,5-2,5 días en medio libre de suero StemSpan (StemCell Technologies) suplementado con L-glutamina 2 mM y el siguiente cóctel de citoquinas: Hscf 100 ng/ml, ligando de hFlt3 100 ng/ml, TPO 100 ng/ml (PeproTech). Para el análisis a largo plazo, las células se mantuvieron en condiciones de cultivo celular estándar a una densidad celular de 0,5-1x10<sup>6</sup>/ml hasta el día 14 después de la nucleofección. Posteriormente, el medio de cultivo celular se cambió gradualmente por X-VIVO 20 (Lonza) suplementado con L-glutamina 2mM y el mismo cóctel de citoquinas que se describió precedentemente.

#### Nucleofección de células hCD34<sup>+</sup>.

50 Se nucleofectaron 1x10<sup>6</sup> células por muestra con 10 µg de transposón SB y 5 µg de la construcción SB transposasa, ambos provisto ya sea en la forma de ADN plasmídico o de ADN minicircular. En los estudios de administración de genes basados en SNIM.RNA, el vector de ADN portador de la transposasa SB100X fue reemplazado por 5 o 10 µg de la construcción SNIM.RNA-CMV.SB100X. Las células se nucleofectaron usando el Nucleofector 4D (Lonza) y el programa E0100. Después de la nucleofección, las células se resuspendieron en 2 ml de medio StemSpan completo.

#### Ensayo de exclusión con azul de tripán (TB).

60 La exclusión basada en TB de células muertas para determinar la viabilidad celular se realizó 2 días después de la nucleofección. Para ello, se cosechó un volumen igual del cultivo HSC y se tiñó con 0,4% de solución TB. Las células viables, no teñidas, se contaron usando el contador de células automático TC20 (Bio-Rad).

#### Análisis de separación de células activada por fluorescencia (FACS).

65 La eficacia de la administración de genes transitoria y estable se estimó mediante citometría de flujo los días 2 y 14/15 después de la nucleofección, respectivamente. La viabilidad celular se determinó el día 2 después de la

nucleofección. Para ello, se recolectó aproximadamente 1/10 del volumen del cultivo celular, se lavó con PBS y se tiñó con una solución de PBS/4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI). A continuación, las células fueron sometidas a FACS usando el citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences). La sincronización de la señal Venus se llevó a cabo en la población de células negativas para DAPI. Los resultados se analizaron usando el software para citometría de flujo FCS Express 4 (De Novo Software).

#### Ensayo con unidades formadoras de colonias (CFU).

La diferenciación *in vitro* de los progenitores hematopoyéticos se indujo el día 2 después de la nucleofección. Para ello, se sembraron 4.000-4.500 células/ml por triplicado en medio de metilcelulosa MethoCult H4434 Classic (Stemcell Technologies) enriquecido con un cóctel de citoquinas capaz de sustentar la formación de unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E), unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), unidades formadoras de colonias de granulocitos, macrófagos (CFU-GM) y unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritroides, de macrófagos, de megacariocitos (CFU-GEMM). Después de por lo menos 16 días de cultivo, las CFU se identificaron morfológicamente y se contaron usando el microscopio Nikon Eclipse Ti-S (Nikon). Las imágenes representativas de cada tipo de colonia de células se tomaron con una cámara monocromática usando el objetivo 10x y el software NIS Elements (Nikon).

#### PCR en tiempo real.

La cuantificación del VCN genómico en la población total de células se realizó mediante PCR en tiempo real después de por lo menos 3 semanas de expansión del cultivo celular. Para ello, se recolectaron células nucleofectadas y expandidas y se aisló el ADN genómico (ADNg) usando el kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. A fin de excluir el ADN plasmídico residual del molde de amplificación del ADNg, la fracción de ADN obtenida fue sometida a una digestión de restricción durante la noche a 37 °C usando la enzima de restricción DpnI sensible a metilación. La digestión se separó luego sobre un gel de 0,8% de agarosa. Se recortó la banda que representa al ADNg y se purificó el ADNg con el kit de recuperación de fragmentos grandes de ADN Zymoclean (Zymo Research). La PCR en tiempo real se llevó a cabo por triplicado usando el kit KAPA SYBR FAST Universal (PeqLab) y el equipo LightCycler (Roche). Los integrantes genómicos del transposón SB se detectaron usando los cebadores SB-IRDR-R\_FW: 5'-GCTGAAATGAATCATTCTCTACTATTATTCTGA-3' (SEQ ID N°: 10) y SB-IRDR-R\_RV: 5'-AATCCCTGTCTTAGGTCAGTTAGGA-3' (SEQ ID N°: 11). El contenido de ADNg se normalizó basado en la amplificación del gen TERT usando los cebadores TERT\_FW: 5'-GACAAAGTACAGCTCAGGCG-3' (SEQ ID N°: 12) y TERT\_RV: 5'-TTCAGCGTGCTCAACTACGA-3' (SEQ ID N°: 13). Las condiciones de la PCR fueron: 95 °C durante 10 min y 45 ciclos de (95 °C por 10 s, 60 °C por 20 s, 72 °C por 10 s). El VCN final se determinó usando estándares de ADNg clonales portadores de una cantidad definida de inserciones genómicas de un transposón SB. Los resultados se analizaron usando el Software LightCycler 96 (Roche).

#### PCR digital en gotas.

La cuantificación del VCN genómico a partir de las CFU se llevó a cabo mediante PCR digital en gotas después de por lo menos 3 semanas de expansión de las CFU en medio de metilecelulosa. Para ello, se repicaron colonias individuales de células hCD34<sup>+</sup> derivadas de 3 reacciones de nucleofección independientes diferenciadas *in vitro* y se aisló el ADNg usando Quick-gDNA MicroPrep (Zymo Research). A fin de excluir el ADN plasmídico residual del molde de amplificación del ADNg, la fracción de ADN obtenida fue sometida a una digestión durante la noche a 37 °C usando la enzima de restricción DpnI sensible a metilación. Posteriormente, se fragmentó el ADNg mediante digestión por 2 h a 25 °C usando la enzima de restricción CviQI. La cuantificación del VCN genómico se llevó a cabo usando el Sistema de PCR digital en gotas QX100 (Bio-Rad) y la Supermezcla para Sondas ddPCR (Bio-Rad). Los integrantes SB se detectaron mediante amplificación de repeticiones invertidas directas (RIR) del transposón usando los cebadores RIR\_FW: 5'-GAATGTGATGAAAGAAATAAA-3' (SEQ ID N°: 14) y RIR\_RV: 5'-AGTTTACATACACCTTAGCC-3' (SEQ ID N°: 15) y la sonda específica de RIR: 5'-FAM-TGGTGATCCTAACTGACCTAAGACAGG-BH1-3' (SEQ ID N°: 16). Los resultados se normalizaron en base a la amplificación del gen RPP30 usando los cebadores RPP30\_FW: 5'-GGTAACTACAGCTCCCAGC-3' (SEQ ID N°: 17) y RPP30\_RV: 5'-CTGTCTCCACAAGTCCGC-3' (SEQ ID N°: 18). La sonda 5'-HEX-TGGACCTGCGAGCGGGTTCTGACC-BH1-3' (SEQ ID N°: 19) sirvió luego para la detección de los amplicones RPP30. Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (94 °C por 10 s, 53 °C por 20 s, 60 °C por 10 s) y 98 °C por 10 min. Los resultados se analizaron usando el software QuantaSoft (Bio-Rad).

#### **Ejemplo 1:**

#### **Tecnología de minicírculo combinada con la forma de administración del SNIM.RNA sintético de la transposasa SB aumenta la eficacia de la modificación genómica mediada por SB de HSC**

Se combinaron las tecnologías ADN en minicírculo y SNIM.RNA para la administración respectiva del vector del transposón SB y el ARNm de la transposasa SB100X. Con este enfoque de administración dual se concibió una mejora sinérgica de la viabilidad celular después de la nucleofección y la integración de transgenes mediada por SB

en el genoma de células hCD34<sup>+</sup>. Se evaluaron varias condiciones con cantidades crecientes de los componentes del sistema del transposón SB provistas en tres variantes de administración (la plataforma de ADN plasmídico simple, de ADN en minicírculo simple y combinada de ADN en minicírculo SNIM.RNA) con respecto a los índices de viabilidad celular después de la nucleofección y la administración transitoria y estable de genes. La eficacia de la modificación genética mediada por SB del genoma de HSC se evaluó en la población total de células en términos del porcentaje de células Venus positivas, intensidad de la señal Venus (valores MFI), índices de transposición y, finalmente, la cantidad de inserciones del transposón por célula (VCN) (**Figura 1A,B**).

A fin de intentar estimar los niveles de toxicidad de la nucleofección después de una administración del sistema del transposón SB basada en plásmidos, minicírculos y minicírculo/SNIM.RNA, se implementó el método de tinción con azul de tripán (TB) y exclusión de células muertas después del recuento de las células no teñidas y por ende viables. Para validar los resultados obtenidos en el ensayo de exclusión con TB, las células se tiñeron adicionalmente con 4',6-diamidín-2-fenilindol (DAPI) y fueron sometidas a separación de células activadas por fluorescencia (FACS), con lo cual se estimó el porcentaje de la población de células DAPI negativas y por ende viables. Ambas mediciones se efectuaron el día 2 después de la administración.

La administración basada en ADN plasmídico del sistema del transposón SB en condiciones estándar, basales (10 µg de pSB.CAGGS.Venus y 5 µg de pCMV.SB100X por  $1 \times 10^6$  células) dio como resultado niveles relativamente bajos de transferencia genética transitoria (-33% de células Venus positivas el día 2 después de la administración) (**Figura 1A**). La eficacia de la transferencia genética transitoria no mejoraba con el suministro de mayores cantidades de ambos vectores SB, lo cual sugiere una saturación del sistema. Notablemente, la plataforma de ADN en minicírculo dio como resultado una administración de genes transitoria mejorada medida mediante expresión de Venus el día 2 después de la electroporación, alcanzando >50% de células Venus positivas (**Figura 1A**). Notablemente, la transfección transitoria aumentada de los componentes del transposón en minicírculo se manifiesta como mayores índices de transposición, porque -35% de las células transfectadas aparentemente experimentaron transposición y retuvieron la señal Venus después de dos semanas de expansión celular (**Figura 1B**), a diferencia del -5% de expresores de Venus a largo plazo que se observa en las muestras transfectadas con el plásmido. El VCN genómico promedio para estas dos variantes de ADN en minicírculo era de  $1,15 \pm 0,74$  y  $2,17 \pm 0,06$  por célula en la población total, respectivamente (**Figura 1 B**).

Finalmente, cuando se complementó el transposón SB.CAGGS.Venus en círculo con la tecnología SNIM.RNA que constituye una fuente transitoria de la expresión y actividad de la transposasa SB100X, la mejora en la modificación genómica estable de células hCD34<sup>+</sup> era aún más pronunciada. Ya para el día 2 después de la administración, se pudo observar una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas para el informante Venus entre las variantes de administración de ADN en minicírculo simple y ADN en minicírculo/SNIM.RNA que contienen la misma cantidad de la fuente del transposón SB (10 µg) y transposasa SB100X (5 µg). La administración de SB basada en ADN en minicírculo SNIM.RNA se manifestó en >70% (n=5) de las células que expresan Venus transitoriamente (**Figura 1A**), lo cual representa un aumento del -40% de la cantidad de células transfectadas de manera transitoria en comparación con la respectiva variante de ADN en minicírculo pleno. Dado que se proporcionaron cantidades iguales del casete informante Venus del mismo antecedente del vector de ADN (ADN en minicírculo) en ambas condiciones, las diferencias observadas en las eficacias de la administración de genes transitoria solamente se pueden explicar por la supervivencia mejorada de las células nucleofectadas con SNIM.RNA.SB100X. Notablemente, el reemplazo de la forma del vector de ADN de la administración de transposasa SB100X con las moléculas SNIM.RNA.SB100X (10 µg + 5 µg de cada una, respectivamente) tuvo el efecto más notorio sobre los índices de transposición, y dio como resultado >50% de la población celular que retuvo la expresión de Venus para el día 14 de cultivo (**Figura 1B**). El aumento de la cantidad de donante de transposón SB en minicírculo no condujo a una mejora adicional en los índices persistentes de administración de genes; en su lugar, se observó una ligera caída en el desempeño general del sistema.

Esto podría provenir de la saturación del sistema y/o de una carga de ADN/ARN relativamente alta aplicada en esta condición de nucleofección, seguida por una viabilidad celular claramente reducida. En las dos mejores combinaciones de ponderación de la administración dual de ADN SNIM.RNA del sistema del transposón SB, se determinó que el promedio VCN era de  $2,47 \pm 1,10$  y  $1,94 \pm 1,04$  por célula en la población total tras la administración de 5 y 10 µg de SNIM.RNA.SB100X, respectivamente.

En resumen, una valoración cuidadosa y análisis exhaustivo de las diferentes plataformas no virales utilizadas para el suministro intracelular y la actividad del sistema de transposón SB revelaron un rendimiento relativamente débil de la transferencia genética basado en ADN plasmídico a las HSC mediante nucleofección. La plataforma de ADN en minicírculo claramente superó la forma de ADN plasmídico convencional de la administración de SB a células hCD34<sup>+</sup>. El refinamiento adicional de la plataforma de administración mediante complementación del transposón SB en minicírculo con SNIM.RNA modificado químicamente como fuente de la transposasa SB100X dio como resultado niveles aún más mejorados de modificación del genoma de HSC.

Según se muestra en la **Figura 3A**, que resume los resultados obtenidos mediante exclusión TB automática de células muertas, se indujo una ligera toxicidad celular por la propia nucleofección (control simulado), pero fue más pronunciada cuando se incluyó un ADN exógeno en la reacción, donde el ADN plasmídico era en promedio 1,25

veces más tóxico que el ADN en minicírculo de la misma masa ( $54,8 \pm 5,9\%$  contra  $70,0 \pm 4,9\%$  de células viables, respectivamente). Una reducción adicional de la carga de ADN en minicírculo en la muestra conservando la molaridad era aún más eficaz y dio como resultado un aumento de 1,55 veces en la cantidad ( $82,5 \pm 4,1\%$ ) de células viables en comparación con su contraparte plasmídica. El reemplazo de la forma de vector de ADN para la administración de la transposasa SB100X por la plataforma SNIM.RNA dio como resultado  $71,4 \pm 5,3\%$  (un aumento de 1,33 veces) y  $72,9 \pm 5,8\%$  (un aumento de 1,35 veces) de células viables detectadas después de la administración de MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10, respectivamente, en comparación con la condición basal del ADN plasmídico. Si bien era ligeramente mejor, no hubo una mejora significativa en la viabilidad celular entre la muestra MC-SB 10 + 5 y ambas MC/SNIM.RNA-SB. La menor citotoxicidad que acompaña a la administración de las plataformas MC y SNIM.RNA demostrada con el ensayo de exclusión TB se confirmó mediante tinción adicional de las células con DAPI y posterior estimación proporcional de la población de células DAPI negativas mediante FACS. Según lo esperado, la viabilidad celular estaba más comprometida cuando se introdujo el sistema de transposón SB en la forma de vectores de ADN plasmídicos convencionales con tan solo  $61,3 \pm 8,5\%$  de células DAPI negativas y, por ende, de células vivas detectadas dentro de la población celular total (**Figura 3B**). Nuevamente, se conservaba una mayor viabilidad celular ( $86,2 \pm 3,0\%$  de células viables; un aumento de 1,5 veces) después de la administración de una cantidad equimolar de una variante de ADN en minicírculo del sistema del transposón SB basado en ADN plasmídico. La implementación de una cantidad de igual masa de vectores de ADN en minicírculo condujo a un aumento de 1,15 veces en el porcentaje de células viables ( $73,5 \pm 7,4\%$ ) en comparación con la muestra de ADN plasmídico, y este efecto se mantuvo cuando se empleaba la plataforma SNIM.RNA para la administración de la transposasa SB100X, con un  $76,2 \pm 6,6\%$  y  $73,6 \pm 7,3\%$  de células viables medidas en la condición de MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10, respectivamente, lo cual sustenta los datos obtenidos con el ensayo de exclusión TB. Cabe destacar que, como consecuencia del aumento de la supervivencia celular después de la administración de MC-SB y MC/SNIM.RNA-SB, la cantidad total de células obtenidas después de una proliferación prolongada *in vitro* durante por lo menos 3 semanas también fue mayor en comparación con la condición de pSB mediante examen con microscopio de los cultivos celulares nucleofectados. En su conjunto, se ha demostrado que es posible reducir significativamente la pérdida excesiva de viabilidad de las HSC relacionada principalmente con la presencia del ADN plasmídico en la reacción mediante la implementación de la plataforma de ADN en minicírculo solo o en combinación con la tecnología SNIM.RNA para la administración intracelular del sistema del transposón SB.

Los datos precedentes demuestran que es posible mejorar la transferencia estable de genes mediante un sistema del transposón SB no viral en HSC a implementarse con fines de una terapia genética. Los experimentos anteriores tuvieron por objeto superar las deficiencias de la administración del sistema basado en el ADN plasmídico, en particular para la modificación del genoma de HSC. Dada su simplicidad y elaboración económica, los vectores de ADN plasmídico siguen siendo la forma de administración común del sistema del transposón SB en tipos de células muy transfectables. Sin embargo, la administración intracelular de vectores plasmídicos se vuelve ineficiente y, a su vez, compromete los índices generales de modificación del genoma mediada por SB, en particular cuando se aplica a tipos celulares difíciles de transfectar, incluidas las HSC. Notablemente, el pasaje eficaz de un vehículo de administración de genes terapéutico a través de las membranas celulares es un prerrequisito para una corrección genética exitosa del compartimento HSC del paciente y, por lo tanto, para lograr beneficios terapéuticos del tratamiento de terapia genética aplicada.

Con los esfuerzos precedentes destinados a un refinamiento del sistema del transposón SB para la aplicación de una terapia genética, como se demostró precedentemente, fue posible aumentar los índices de transferencia genética estable utilizando una fuente de ARNm de la transposasa SB100X. Al aprovechar el enfoque de ARNm para la administración intracelular del componente transposasa del sistema, se evitan los obstáculos adicionales de transferencia de genes típicos de los vectores de ADN plasmídico. Tras la aplicación de un pulso eléctrico, el ARNm es translocado al citoplasma y luego se encuentra fácilmente disponible para la maquinaria de traducción del huésped y la producción de proteínas. Una señal de localización nuclear presente en las moléculas SB100X las dirige al núcleo celular, donde se produce la transposición real y la integración del transgén en el genoma. Esta estrategia parecía ser adecuada, en especial en los estudios precedentes de transferencia genética basados en HSC. El potencial del ARNm que codifica la transposasa SB para sustentar de manera eficiente la integración del transposón SB administrado con un ADN plasmídico se ha mostrado previamente en un contexto preclínico terapéutico mediante corrección genética del tejido hepático *in vivo* (Wilber y col., 2007). En el presente enfoque de una administración de genes estable, se utilizó la transposasa SB100X hiperactiva y la nueva tecnología de SNIM.RNA sintético basado en el método de reemplazo de uridina y citidina, lo que dio como resultado una mayor estabilidad y una menor inmunogenicidad del ARNm producido (Kormann y col., 2011). Se aplicaron modificaciones químicas análogas para producir ARNm de la transposasa SB100X y esto podría haber sido crucial para reforzar el proceso de transposición de SB.

Notablemente, el sistema del transposón SB refinado mediante la implementación de las tecnologías SNIM.RNA, posiblemente en combinación con el ADN en minicírculo, también ofrece varias ventajas de bioseguridad ante los vectores convencionales de ADN plasmídico utilizados comúnmente para su administración intracelular. Para la plataforma de administración de ADN en minicírculo en particular, la ausencia de elementos de esqueleto bacterianos, tal como un gen de resistencia a antibióticos y un origen de replicación bacteriano, en los vectores terapéuticos es muy relevante para la aplicación clínica. En especial, los genes de resistencia a antibióticos incluidos

en un producto celular terapéutico y su posible diseminación descontrolada en la flora bacteriana del paciente mediante transferencia horizontal de genes luego del trasplante de las HCS representan algunas preocupaciones de seguridad. La implementación de una fuente de ARNm para la administración transitoria del componente transposasa del sistema SB aumenta adicionalmente el nivel de bioseguridad del presente enfoque, ya que el ARNm no conlleva el riesgo de una integración cromosómica. Se sabe que la electroporación del ADN plasmídico está asociada con un riesgo insignificante, sin embargo, sí con una posible integración espontánea del vector en el genoma del huésped (Wang y col., 2004). No se puede pasar por alto la integración hipotética de la secuencia codificante de SB100X en el genoma celular que conduce a una expresión prolongada de la transposasa en la aplicación de una terapia genética, ya que daría como resultado una movilización continua del transposón ya integrado y, por ende, inestabilidad genómica. El reemplazo de la forma de vector de ADN de la transposasa para una administración basada en ARNm parece ser una solución óptima, ya que evita por completo una integración y expresión no intencionadas de la secuencia codificante de la transposasa en el genoma.

En resumen, el presente enfoque mejora en gran medida la eficacia de la modificación del genoma mediante el uso de SNIM.RNA, posiblemente en combinación con la tecnología de ADN en minicírculo, para la administración y actividad intracelular de un sistema de transposón. El agotamiento basado en recombinación de las secuencias de esqueleto bacterianas de los plásmidos convencionales dio como resultado la generación del transposón de ADN en minicírculo y vectores de transposasa de tamaño reducido. Su implementación en las células condujo a una mejora significativa en la administración de genes transitoria y estable al aumentar la cantidad de unidades de expresión de transgenes por ponderación del ADN con la disminución simultánea de niveles altos de toxicidad celular inducida por nucleofección con plásmidos.

### Ejemplo 2:

#### Administración intracelular mejorada del sistema del transposón SB a partir de la plataforma de ADN en minicírculo en HSC humanas

Se pueden lograr niveles altos de modificación genómica de las HSC difíciles de transfectar por medio de una tecnología integradora no viral, en primer lugar, mediante una administración intracelular eficiente del sistema de vectores implementado. El tamaño del vector es un modulador potente de este parámetro, y las construcciones más pequeñas tienden a ingresar al interior de la célula y alcanzar al núcleo de una manera más eficiente que las más grandes (Hu et al, 2014). A la luz de estos hechos, se ha implementado una plataforma de ADN en minicírculo para reducir significativamente el tamaño de los vectores del transposón SB y de la transposasa y, por lo tanto, para mejorar el índice de su administración intracelular con el objeto final de lograr niveles suficientes de modificación del genoma de las HSC para que sea implementado con fines de una terapia genética. Se examinaron los niveles de administración intracelular de los vectores SB el día 2 después de la nucleofección (administración de genes transitoria) mediante un análisis FACS. Se comparó el desempeño de la plataforma de ADN en minicírculo solo o en combinación con la tecnología SNIM.RNA con la del ADN plasmídico en términos de porcentaje e intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células Venus positivas.

En general, se detectó la señal informante Venus a una frecuencia más alta y con una mayor intensidad en la población celular analizada cuando se había implementado la plataforma de ADN en minicírculo para administrar ambos componentes del sistema de transposón SB, y esto no solo se observó en una comparación de peso a peso sino también en una comparación molar a molar (**Figuras 4A y B**). La cantidad de células que expresan Venus originarias de hCD34<sup>+</sup> era significativamente mayor para la plataforma de ADN en minicírculo, proporcionando una eficacia global de electroporación de  $74,9 \pm 1,2\%$  y  $64,1 \pm 2,9\%$  en una comparación de masa equivalente y equimolar con el sistema de ADN plasmídico, respectivamente (**Figura 4A**). Por el contrario, solamente se pudo obtener un  $44,7 \pm 2,2\%$  de células que expresan Venus de manera transitoria usando la plataforma de ADN plasmídico estándar. Además, la mejora de la internalización de la plataforma de minicírculo también se vio reflejada por el MFI de las células Venus positivas. Específicamente, la implementación del ADN plasmídico fue la menos eficaz y condujo a índices de MFI de tan solo  $1.516 \pm 154$  (**Figura 4A**). Hubo un aumento de 2,6 y 1,7 veces en los valores de MFI obtenidos en condiciones de peso equivalente ( $4.005 \pm 264$ ) y equimolares ( $2.581 \pm 247$ ), respectivamente. Notablemente, aunque se implementó el mismo tipo (ADN en minicírculo) y cantidad (10 µg) del vector de transposón SB en tres variantes de administración diferentes (equivalente en masa de MC-SB, MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10), se obtuvieron índices de MFI ligeramente diferentes en esas muestras, obteniéndose los valores más altos cuando la forma de ADN MC de la transposasa SB era reemplazada por la tecnología de SNIM.RNA y el mejor resultado cuando se proporcionaba una cantidad doble de SNIM.RNA-SB (MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10:  $5.870 \pm 550$ ; MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5:  $5.239 \pm 364$ ). Esto sugiere que este punto del análisis de administración de genes transitoria (día 2 después de la nucleofección) ya puede reflejar parcialmente la eficacia de la transposición y por ello de una administración de genes estable, ofreciendo así una sugerencia fuerte que la combinación MC/SNIM.RNA es la más eficaz también para la integración genómica de SB. Además, para la administración de genes transitoria, cuando se combinaron el porcentaje y los valores de MFI de las células Venus positivas, lo que resultó en índices de eficacia relativa de la administración de genes transitoria, la mejora en la administración del sistema de transposón SB fue aún más pronunciada para el ADN en minicírculo solo o en combinación con la tecnología SNIM.RNA (**Figura 4B**). Más específicamente, este valor relativo de la eficacia de administración de genes era 2,5 ( $167.931 \pm 24.114$ )- y 4,4 ( $300.531 \pm 22.234$ ) veces mayor para el ADN en

minicirculo en una comparación molar a molar y peso a peso con el ADN plasmídico ( $68.441 \pm 9.463$ ), respectivamente.

La transferencia de genes ventajosa promovida por el ADN en minicirculo fue aún más notoria en las muestras para las cuales se había implementado la tecnología SNIM.RNA para la administración de la transposasa SB100X, con un aumento de 6,1 ( $417.189 \pm 33.956$ )- y 6,8 ( $468.790 \pm 53.083$ ) veces con relación a los niveles de administración de genes transitoria detectados con las variantes de administración MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10, respectivamente.

En su conjunto, la plataforma de ADN en minicirculo, sola o en combinación con la tecnología SNIM.RNA, permite administrar el sistema del transposón SB a las HSC de manera significativamente más eficaz que con los plásmidos convencionales.

### Ejemplo 3:

**El sistema del transposón SB en la forma de las plataformas de ADN en minicirculo y ADN en minicirculo/SNIM.RNA es más eficaz en términos de una administración de genes estable en comparación con su contraparte de ADN plasmídico, donde la combinación de ADN en minicirculo/SNIM.RNA era superior a las demás variantes de administración del sistema**

El objeto principal que soporta la implementación de las tecnologías de ADN en minicirculo y SNIM.RNA era mejorar la administración de genes estable no viral en las HSC difíciles de transfectar. A fin de evaluar el rendimiento del vector en términos de la modificación del genoma mediada por SB, se mantuvieron células hCD34<sup>+</sup> nucleofectadas en cultivo por un período de tiempo prolongado. Según lo esperado, los niveles iniciales de expresión del informante Venus disminuyeron gradualmente durante la expansión celular posterior a la nucleofección, y los vectores de plásmidos y en minicirculo probablemente experimentaron degradación celular por las nucleasas citosólicas (Lechardeur y col., 1999) y se excluyeron sucesivamente de los cultivos celulares con cada división celular. El plásmido residual atenuado lentamente y la expresión transgénica específica del ADN en minicirculo entonces no eran detectables mediante el análisis FACS realizado el día 14/15 después de la administración del vector. Cualquier señal Venus detectable en este momento derivaba de la expresión del transgén específico del locus cromosómico como consecuencia de la integración del casete mediado por SB en el genoma de las HSC. De manera análoga al análisis de una administración de genes a corto plazo, se evaluó el porcentaje y MFI de las células Venus positivas en una población derivada de células hCD34<sup>+</sup> expandidas como una medida de la administración de genes estable y de la actividad integradora del sistema del transposón SB.

Tal como se muestra en la **Figura 5A**, la administración basada en ADN plasmídico menos eficiente del sistema del transposón SB en la células hCD34<sup>+</sup> también sustentaba una integración transgénica muy pobre y condujo a tan solo un 0,8 ( $\pm 0,2$ )% de células que expresan Venus con un MFI general de  $405 \pm 63$  medido el día 14/15 después de la nucleofección. Por el contrario, implementación de la plataforma de ADN en minicirculo equivalente a una de ADN plasmídico en cantidades molares dio como resultado una representación significativamente mayor ( $6,1 \pm 0,7\%$ ) de células portadoras de al menos una copia del transposón SB.CAGGS.Venus en su genoma. También se observó una integración de SB mejorada a partir de vectores de ADN en minicirculo como un valor de MFI 6,8 veces mayor para la señal Venus ( $2.754 \pm 403$ ). Según lo esperado, en una comparación de peso a peso de las dos plataformas de administración, el desempeño superior de la forma basada en ADN en minicirculo ante el ADN plasmídico convencional del sistema del transposón SB era aún más evidente, produciendo  $16,0 \pm 1,6\%$  de células de origen hematopoyético que expresan Venus y sus valores de MFI de  $5.231 \pm 726$ . Finalmente, la mayor mejora en una administración de genes persistente se pudo alcanzar cuando el transposón SB.CAGGS.Venus basado en ADN en minicirculo era complementado con la tecnología SNIM.RNA que constituye la fuente transitoria de la expresión y actividad de la transposasa SB100X, con un  $25,5 \pm 1,7\%$  y  $34,4 \pm 1,7\%$  de células Venus positivas con valores MFI de  $4.207 \pm 523$  y  $5.117 \pm 410$  detectadas en las variantes de administración MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10, respectivamente. Aún más, después de combinar el porcentaje de células Venus positivas con los valores de MFI, el análisis de la eficacia relativa resultante de la transferencia de genes estable reveló un rendimiento superior importante del enfoque de los autores de administración doble de ADN en minicirculo SNIM.RNA ante los vectores de ADN plasmídico utilizados convencionalmente para introducir el sistema del transposón SB en el interior de las células. La eficacia relativa calculada de administración de genes alcanzó el valor de  $106,793 \pm 12,647$  y  $175,297 \pm 14,299$  en el caso de las variantes de administración MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10, respectivamente (**Figura 5B**). La transposasa SB100X provista en la forma de ADN en minicirculo fue en general menos eficiente que su versión SNIM.RNA, con un valor de administración de genes relativamente estable de  $15,069 \pm 292$  y  $2,807 \pm 58$  determinado para el equivalente de masa y molar de la plataforma de ADN plasmídico, respectivamente. Sin embargo, la plataforma basada en ADN en minicirculo era aún mucho más eficaz que su contraparte de ADN plasmídico para sustentar la modificación del genoma de las HSC específica de SB. La implementación del sistema del transposón SB en la forma de ADN plasmídico utilizado convencionalmente permitió obtener un valor relativo de administración de genes estable a las células hCD34<sup>+</sup> de tan solo  $290 \pm 69$ , que es aproximadamente 600 veces peor que el obtenido con la mejor condición de los autores (MC/SNIM ARN-SB 10 + 10).

Otra manera de medir el potencial del sistema del transposón SB en términos de una administración de genes

estable es la estimación de los índices de transposición. A fin de verificar este parámetro para las tres plataformas diferentes utilizadas para administrar el transposón SB intracelular y los componentes de transposasa, se combinaron las eficacias de administración de genes transitorias (día 2) y estables (día 14/15) evaluadas mediante FACS y se evaluó el porcentaje de fracción celular que retuvo la expresión inicial de Venus después de una expansión celular prolongada. La plataforma de ADN en minicírculo se asoció con niveles significativamente más altos del mecanismo de "cortar y pegar" de la transposición de SB en comparación con el desempeño de la plataforma de ADN plasmídico convencional, donde un  $21,4 \pm 2,2\%$  y  $9,5 \pm 0,7\%$  de células que conservan la señal Venus en términos de masa equivalente y equimolar de las variantes de administración en minicírculo, respectivamente (Figura 3C). Por el contrario, tan solo un  $1,8 \pm 0,5\%$  de la fracción de células inicialmente Venus positivas presentaron transposición después de una administración basada en ADN plasmídico del sistema del transposón SB y expresaron el transgén Venus a partir de loci cromosómicos los días 14/15 después de la nucleofección. La transposasa SB100X provista en la forma de SNIM.RNA soportaba el nivel más alto de transposición; en una condición con una cantidad menor de SNIM.RNA-SB100X (SNIM.RNA-SB 10 + 5) se observó en tanto como un  $32,1 \pm 2,0\%$  de las células buscadas por el vector la transposición de SB y la integración genómica del casete Venus. De manera esperable, los niveles de transposición alcanzaron hasta un  $43,4 \pm 2,4\%$  cuando se usaba una cantidad doble de SNIM.RNA-SB100X, lo cual confirma una vez más el desempeño superior del enfoque de administración dual MC/SNIM.RNA-SB.

#### Ejemplo 4:

**La modificación genética mediada por SB no afecta el potencial de HSC *in vitro* y se puede recuperar la mayor cantidad de colonias hematopoyéticas portadoras del transgén después de una administración del sistema basada en ADN en minicírculo/SNIM.RNA**

Para evaluar si las células hCD34<sup>+</sup> nucleofectadas y modificadas con SB retuvieron su capacidad para diferenciarse en células sanguíneas de diferentes tipos, se utilizó el ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU) *in vitro* usando las tres mejores variantes de administración, es decir MC-SB 10 + 5, MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10. El recuento de las colonias Venus positivas formadas en medio de metilcelulosa después de la administración del sistema del transposón SB en ADN en minicírculo y ADN en minicírculo SNIM.RNA complementó adicionalmente el análisis de la eficacia de una administración de genes estable.

En cada uno de tres ensayos CFU realizados de manera independiente, se pudo demostrar una diferenciación potencial de las HSC modificadas genéticamente y se recuperaron unidades formadora de colonias y de brotes de tipos celulares eritroides (BFU-E/CFU-E), unidades formadoras de colonias de macrófagos y granulocitos (CFU-GM) y unidades formadoras de colonias mixtas de los tipos mieloide y eritroide (CFU-GEMM) después de una administración basada en ADN en minicírculo y ADN en minicírculo/SNIM.RNA y la actividad integradora del sistema del transposón SB. Las diferencias entre las tres variantes de administración evaluadas fueron claramente visibles con respecto a la contribución de las CFU Venus positivas en las cuentas de CFU totales (Figura 6). Y, por ende, se asoció el sistema del transposón SB en la forma de ADN en minicírculo administrado según una base de masa equivalente con su contraparte de ADN plasmídico (MC-SB 10 + 5) con  $21,7 \pm 2,2\%$  de CFU con una expresión de Venus detectable a largo plazo. Específicamente, se recuperó un  $21,0 \pm 2,7\%$ ,  $24,7 \pm 2,7\%$  y  $15,0 \pm 1,8\%$  de BFU-E/CFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM Venus positivas, respectivamente, en dicha condición. La plataforma MC/SNIM.RNA era más eficaz para soportar la transposición de SB, lo cual dio como resultado  $29,1 \pm 2,5\%$  de CFU que expresan Venus en la variante de administración MC/SNIM.RNA 10 + 5. Con mayor detalle, se observó una aparición 1,3 ( $27,1 \pm 3,7\%$ ), 1,3 ( $32,7 \pm 2,6\%$ ) y 1,6 ( $24,6 \pm 2,8\%$ ) veces más frecuente de colonias de tipo eritroide (BFU-E/CFU-E), de granulocitos/macrófagos (CFU-GM) y mixtas (CFU-GEMM) modificadas con SB, respectivamente, en esta muestra cuando se comparaba con la condición MC-SB 10 + 5. De manera similar a los resultados obtenidos después del análisis basado en FACS de una administración de genes estable, la combinación MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10 del sistema del transposón SB parecía ser la más eficaz para la modificación genómica de las HSC y en promedio dio como resultado un  $41,1 \pm 3,4\%$  de colonias que expresan Venus (un aumento de 1,9 veces en comparación con la condición MC-SB 10 + 5), donde un  $40,1 \pm 4,5\%$ ,  $42,6 \pm 2,4\%$  y  $38,8 \pm 5,7\%$  de BFU-E/CFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM, respectivamente, portaban la señal Venus.

En resumen, la manipulación del genoma de las HSC mediante el sistema del transposón SB administrado intracelularmente por medio de nucleofección no interfiere con la hematopoyesis inducida *in vitro* y la forma de ADN en minicírculo/SNIM.RNA del sistema conduce al mayor número de CFU portadoras del transgén detectado en toda la población de CFU.

#### Ejemplo 5:

**Las plataformas de ADN en minicírculo y ADN en minicírculo/SNIM.RNA-SB se asocian con una integración eficaz de transgenes y permite recuperar la mayor cantidad de integrantes de vectores después de una administración basada en ADN/SNIM.RNA del sistema del transposón SB**

A continuación, se evaluó la cantidad de integraciones del transposón SB obtenida por genoma de HSC, otro parámetro que refleja la eficacia de la administración de genes persistente. Para ello, se llevó a cabo una PCR

cuantitativa usando las células totales cosechadas luego de un tiempo prolongado de propagación celular después de la nucleofección. En este tipo de análisis, se incluyeron tanto genomas que portaban inserciones del transposón SB como aquellos sin ningún casete Venus integrado. Con el fin de restringir el análisis solamente a aquellas células en las cuales definitivamente tuvo lugar una transposición, se recolectaron las CFU Venus positivas individuales generadas en un medio de metilcelulosa y se aisló el ADN genómico y se lo sometió a PCR digital en gotas. Esta nueva tecnología de PCR cuantitativa permitió estimar de manera precisa la cantidad de copias de vectores integrados a nivel clonal celular con una cantidad muy limitada de ADN en la reacción. Para ambos análisis, se seleccionaron tres de los mejores y, por ende, relevantes variantes de administración: MC-SB 10 + 5, MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10.

Según lo estimado mediante una PCR cuantitativa realizada después de la nucleofección y la expansión masiva de las células hCD34+, la cantidad promedio de copias de vectores (VCN) por genoma diploide fue de  $0,24 \pm 0,05$ , cuando se empleaba la administración basada en ADN en micirculo de ambos vectores SB aplicada en la condición MC-SB 10 + 5 (**Figura 7A**). Cuando se implementó la plataforma SNIM.RNA para la administración de la transposasa SB100X, se detectaron  $0,41 \pm 0,15$  y  $0,46 \pm 0,07$  copias del transposón integrado por célula tras la administración de MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10, respectivamente. La tendencia hacia un VCN más alto reflejó la mayor transposición de SB y una mayor eficacia de transferencia de genes estable observada con ambas variantes de administración ADN/SNIM.RNA-SB, en comparación con MC-SB 10 + 5. Por lo tanto, hubo una clara correlación entre el VCN obtenido y la eficacia relativa de la administración de genes estable determinada para cada muestra mediante citometría de flujo los días 14/15 después de la administración (**Figura 7B**).

El análisis de VCN realizado a nivel clonal usando CFU reveló que un 64% de las colonias analizadas llevaban 1 copia del transgén Venus en el genoma, independientemente de la combinación de vectores aplicada para administrar el sistema del transposón SB (**Figura 7A**).

Más específicamente, para la variante de administración MC-SB 10 + 5, entre los 18 CFU analizadas con éxito, 12 albergaban 1 copia del transposón SB por genoma diploide. Se encontraron 2 copias en 3 colonias independientes y las CFU de 3, 4 y 5 copias solo estaban representadas una vez. En la variante de administración MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5, el VCN obtenido fue más homogéneo; en 11 de las 17 CFU analizadas se había integrado 1 copia del transgén Venus por célula, y las restantes 6 CFU llevaron tanto como 2 copias del mismo transgén. La ausencia de CFU con valores más altos de VCN también se correlacionaba con valores MFI ligeramente más bajos recuperados en esta variante de administración, en comparación con MC-SB 10 + 5 y MC/SNIM.RNA-SB 10 + 5 de intensidad de señal Venus estable más alta y similares entre sí (**Figura 5A**). La forma de administración más eficaz del sistema del transposón SB (MC/SNIM.RNA-SB 10 + 10) originó 111 copias de CFU de los 18 que fueron sometidas al análisis (**Figura 7A**). Se encontró que 2, 3 y 4 copias del transposón SB por genoma diploide se encontraban en 2 CFU cada una. De manera excepcional para esta condición, una concentración alta de SNIM.RNA-SB100X presente en la reacción soportó la integración de 7 copias del casete Venus que, sin embargo, solamente se observó en un caso. Se requiere analizar una mayor cantidad de CFU a fin de estimar estadísticamente la probabilidad de presencia de eventos de integración de una sola o múltiples copias.

En resumen, el análisis cuantitativo de la distribución de VCN en las CFU derivadas de una sola célula Venus positiva, así como la realizada en las células totales, que contienen genomas tanto modificados como no modificados, complementaron los datos sobre la eficacia de una administración de genes estable usando citometría de flujo y el ensayo de CFU. El análisis permitió identificar un desempeño muy claramente eficaz de la plataforma de micirculo solo o en combinación con la tecnología SNIM.RNA en términos de administración y actividad integradora del sistema del transposón SB en HSC.

### Ejemplo 6:

#### Perfil aleatorio de integración de transgenes mediada por SB en HSC

Finalmente, se evaluaron los aspectos de bioseguridad del enfoque de administración de genes no virales y se analizó la distribución de las integraciones transgénicas en todo el genoma en HSC humanas después de la administración basada en ADN en micirculo y ADN en micirculo/SNIM.RNA del sistema del transposón SB. Para tal fin, se generó una biblioteca de sitios de inserción basada en PCR usando ADN genómico obtenido después de una expansión de por lo menos tres semanas de células hCD34+ nucleadas con ambas variantes de administración del sistema del transposón SB. La biblioteca fue sometida luego a secuenciación profunda con Illumina y análisis bioinformático. El perfil de integración se determinó con respecto a todos los genes anotados y sus características intrínsecas, incluidos los sitios de inicio de la transcripción (TSS), las regiones no traducidas 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR, respectivamente), intrones y exones.

A nivel de secuencia, se recuperó el dinucleótido TA como sitio altamente preferido de integración de SB en ambas variantes de administración (no se muestran los datos). También hubo una tendencia a que el transposón SB se integrara en una repetición de TA palindrómica de seis bases de longitud, donde hay A y T particularmente conservados presentes en sus extremos 3' y 5', respectivamente. Esta es una firma canónica de la integración

5 cromosómica de SB observada ya en los primeros estudios que descifran el mecanismo de “cortar y pegar” de la transposición de SB (Vigdal y col., 2002). En total, se pudieron encontrar 2.864 y 533 inserciones de transposones SB mapeados de manera única después de la administración en ADN en minicírculo y ADN/SNIM.RNA del sistema, respectivamente (no se muestran los datos). El análisis realizado a nivel genómico reveló que 1039 inserciones (36,28%) en la condición MC-SB y 211 inserciones (39,59%) en la condición MC/SNIM.RNA-SB se encontraban en genes. Los genes de cáncer anotados también se encontraban entre los que albergaban integraciones del transposón SB; 37 y 9 inserciones se encontraban dentro de esta categoría de genes, que comprenden 1,29% y 1,69% de las integraciones SB totales que se observaron a partir de la plataforma de ADN plasmídico y en minicírculo, respectivamente. La mayoría de las inserciones intergenéticas de SB se encontraron en intrones, con una contribución estimada del 35,3% (1011 inserciones) y 38,09% (203 inserciones) al número total de integrantes de Venus recuperados en las muestras de MC-SB y MC/SNIM.RNA-SB, respectivamente. Se encontró una porción muy pequeña de las inserciones cromosómicas en las 5'UTR (0,1% y 0,19%), 3'UTR (0,56% y 1,13%) y exones (0,84% y 1,31%) de los genes después de la administración basada en ADN en minicírculo y ADN en minicírculo SNIM.RNA del sistema del transposón SB, respectivamente. El casete Venus que porta el transposón SB también se integró a una frecuencia relativamente baja cerca de los TSS, donde 117 (4,09%) de dichas inserciones se encontraron en el ADN en minicírculo y 19 (3,56%) en la variante de administración de ADN en minicírculo/SNIM.RNA.

20 En su conjunto, el análisis realizado del integroma de SB reveló un carácter casi aleatorio de la integración transgénica mediada por SB en HSC humanas, y este fue el caso con respecto a todas las características genómicas analizadas e independientemente de la plataforma de administración utilizada en los estudios. No se esperaba observar diferencias pronunciadas entre las estrategias de administración de ADN en minicírculo y ADN en minicírculo/SNIM.RNA, dado que ambas plataformas no son de origen viral y no poseen ningún mecanismo intrínseco de autocodificación requerido para la entrada celular o genómica.

## 25 **Referencias**

30 Anderson, B.R., Kariko, K., y Weissman, D. (2013). Nucleofection induces transient eIF2a phosphorylation by GCN2 and PERK. *Gene therapy* 20, 136-142.

Bai, Y., Soda, Y., Izawa, K., Tanabe, T., Kang, X., Tojo, A., Hoshino, H., Miyoshi, H., Asano, S., y Tani, K. (2003). Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene therapy* 10, 1446-1457.

35 Brooks, A.R., Harkins, R.N., Wang, P., Qian, H.S., Liu, P., y Rubanyi, G.M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *The Journal of Gene Medicine* 6, 395-404. Cattoglio, C, Pellin, D., Rizzi, E., Maruggi, G., Corti, G., Miselli, F., Sartori, D., Guffanti, A., Di Serio, C, y Ambrosi, A., y col. (2010). High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood* 1 16, 5507-5517.

40 Chabot, S., Orio, J., Schmeer, M., Schleef, M., Golzio, M., y Teissie, J. (2013). Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery. *Gene therapy* 20, 62-68.

45 Chen, Z.Y., He, C.Y., Ehrhardt, A., y Kay, M. (2003a). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Molecular Therapy* 8, 495-500.

Chen, Z.Y., He, C.Y., Meuse, L, y Kay, M.A. (2004). Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene therapy* 1 1, 856-864.

50 Chen, Z.-Y., He, C.-Y., Ehrhardt, A., y Kay, M.A. (2003b). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 8, 495-500.

55 Chen, Z.-Y., Riu, E., He, C.-Y., Xu, H., y Kay, M.A. (2008). Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 548-556.

60 Chuang, T.H., Lee, J., Kline, L., Mathison, J.C., y Ulevitch, R. (2002). Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *Journal of Leukocyte Biology* 71, 538-544.

Dad, A.-B., Ramakrishna, S., Song, M., y Kim, H. (2014). Enhanced gene disruption by programmable nucleases delivered by a minicircle vector. *Gene therapy*. Darquet, A., Rangara, R., Kreiss, P., Schwartz, B., Naimi, S., Delaere, P., Crouzet, J., and Scherman, D. (1999). Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Molecular Therapy* 6, 209-218.

- Darquet, A.M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., y Crouzet, J. (1997). A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Molecular Therapy* 4, 1341 -1349. Dupuy, A. J., Akagi, K., Largaespada, D.A., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2005). Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature* 436, 221 -226.
- 5  
Gresch, O., Engel, F.B., Nestic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Korner, I., Gan, L, Chen, S., y Castro-Obregon, S., y col. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods (San Diego, Calif.)* 33, 151-163.
- 10 Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L, Delabesse, E., y Beldjord, K., y col. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation* 118, 3132-3142.
- 15 Hacein-Bey-Abina, S., Kalle, C. von, Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., y Morillon, E., y col. (2003). LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415- 419.
- Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., y Bosserhoff AK (2002). Efficient Transfection Method for Primary Cells. *Tissue engineering* 8, 235-245.
- 20 Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., y Takeda, K., y col. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- 25 Howe, S.J., Mansour, M.R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C, Hubank, M., Kempster, H., Brugman, M.H., Pike-Overzet, K., Chatters, S.J., y Ridder, D. de, y col. (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCI D-X1 patients. *The Journal of clinical investigation* 118, 3143-3150.
- 30 Hu, J., Cutrera, J., y Li, S. (2014). The impact of non-electrical factors on electrical gene transfer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1121, 47-54.
- Huang, X., Guo, H., Tammana, S., Jung, Y.-C, Mellgren, E., Bassi, P., Cao, Q., Tu, Z.J., Kim, Y.C., y Ekker, S.C., y col. (2010). Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and piggyBac transposons in human primary T cells. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1803- 1813.
- 35 Huerfano, S., Ryabchenko, B., y Forstova, J. (2013a). Nucleofection of expression vectors induces a robust interferon response and inhibition of cell proliferation. *DNA and cell biology* 32, 467-479. Huerfano, S., Ryabchenko, B., and Forstova, J. (2013b). Nucleofection of expression vectors induces a robust interferon response and inhibition of cell proliferation. *DNA and cell biology* 32, 467-479.
- 40 Hyde, S.C., Pringle, I.A., Abdullah, S., Lawton, A.E., Davies, L.A., Varathalingam, A., Nunez- Alonso, G., Green, A.-M., Bazzani, R.P., y Sumner-Jones, S.G., y col. (2008). CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* 26, 549-551.
- 45 Ivics, Z., Hackett, P.B., Plasterk, R.H., y Izsvak, Z. (1997). Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91, 501-510.
- Izsvak, Z., Ivics, Z., y Plasterk, R.H. (2000). Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal of molecular biology* 302, 93-102.
- 50 Jechlinger, W., Azimpour Tabrizi, C, Lubitz, W., y Mayrhofer, P. (2004). Minicircle DNA immobilized in bacterial ghosts: in vivo production of safe non-viral DNA delivery vehicles. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 8, 222-231.
- 55 Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., y Kay, M.A., y col. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods* 7, 197-199.
- Kay, M.A., He, C.-Y., y Chen, Z.-Y. (2010). A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nat. Biotechnol.* 28, 1287-1289.
- 60 Kobelt, D., Schleaf, M., Schmeer, M., Aumann, J., Schlag, P.M., y Walther, W. (2013). Performance of high quality minicircle DNA for in vitro and in vivo gene transfer. *Molecular biotechnology* 53, 80-89.
- 65 Kormann, M.S., Hasenpusch, G., Aneja, M., Nica, G., Flemmer, A.W., Herber-Jonat, S., Huppmann, M., Le Mays, Illenyi, M., y Schams, A., y col. (2011). Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA

- in mice. *Nat. Biotechnol.* 29, 154-157. Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H., and Lukacs, G. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene therapy* 6, 482-497.
- 5 Levetzow, G. von, Spanholtz, J., Beckmann, J., Fischer, J., Kogler, G., Wernet, P., Punzel, M., y Giebel, B. (2006). Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem cells and development* 15, 278-285. Luo, G., Ivics, Z., Izsvak, Z., and Bradley, A. (1998). Chromosomal transposition of a Tc1 /mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10769-10773.
- 10 Mátés, L, Chuah, Marinee K L, Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., Grzela, D.P., Schmitt, A., Becker, K., y Matrai, J., y col. (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nature genetics* 41, 753-761.
- 15 Mayrhofer, P., Schlee, M., y Jechlinger, W. (2009). Use of minicircle plasmids for gene therapy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 542, 87-104.
- Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M., y Reich, Z. (2001). A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 3, 653-657.
- 20 Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, Astrid R W, Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R., y Bushman, F.D. (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS biology* 2, E234.
- Mukherjee, S., y Thrasher, A.J. (2013). Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. *Gene* 525, 174-181.
- 25 Osborn, M.J., McElmurry, R.T., Lees, C.J., DeFeo, A.P., Chen, Z.-Y., Kay, M.A., Naldini, L., Freeman, G., Tolar, J., y Blazar, B.R. (2011). Minicircle DNA-based gene therapy coupled with immune modulation permits long-term expression of  $\alpha$ -L-iduronidase in mice with mucopolysaccharidosis type I. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 450-460.
- 30 Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kijhlccke, K., Schilz, A., y Kunkel, H., y col. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1 -EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nature medicine* 12, 401-409.
- 35 Reyes-Sandoval, A., y Ertl, H. (2004). CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 9, 249-261.
- 40 Ronald, J.A., Chuang, H.-Y., Dragulescu-Andrasi, A., Hori, S.S., y Gambhir, S.S. (2015). Detecting cancers through tumor-activatable minicircles that lead to a detectable blood biomarker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 3068-3073.
- Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C, Ecker, J.R., y Bushman, F. (2002). HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell* 110, 521-529.
- 45 Sharma, N., Cai, Y., Bak, R.O., Jakobsen, M.R., Schrader, L.D., y Mikkelsen, J.G. (2013). Efficient sleeping beauty DNA transposition from DNA minicircles. *Molecular therapy. Nucleic acids* 2, e74.
- Singh, H., Figliola, M.J., Dawson, M.J., Olivares, S., Zhang, L., Yang, G., Maiti, S., Manuri, P., Senyukov, V., y Jena, B., y col. (2013). Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PLoS ONE* 8, e64138. Singh, H., Huls, H., Kebriaei, P., and Cooper. *LJ* (2014). A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinicalgrade T cells to target CD19. *Immunological reviews* 257, 181-190.
- 50 Swierczek, M., Izsvak, Z., y Ivics, Z. (2012). The Sleeping Beauty transposon system for clinical applications. *Expert opinion on biological therapy* 12, 139-153.
- Takeda, H., Wei, Z., Koso, H., Rust, A.G., Yew, Christopher Chin Kuan, Mann, M.B., Ward, J.M., Adams, D.J., Copeland, N.G., y Jenkins, N.A. (2015). Transposon mutagenesis identifies genes and evolutionary forces driving gastrointestinal tract tumor progression. *Nature genetics* 47, 142-150.
- 60 Thornhill, S.I., Schambach, A., Howe, S.J., Ulaganathan, M., Grassman, E., Williams, D., Schiedlmeier, B., Sebire, N.J., Gaspar, H.B., y Kinnon, C, y col. (2008). Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 590-598.
- 65

Touzot, F., Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A., y Cavazzana, M. (2014). Gene therapy for inherited immunodeficiency. *Expert opinion on biological therapy* 14, 789-798.

Vaysse, L., Gregory, L.G., Harbottle, R.P., Perouzel, E., Tolmachov, O., y Coutelle, C. (2006). Nuclear-targeted minicirde to enhance gene transfer with non-viral vectors in vitro and in vivo. *The Journal of Gene Medicine* 8, 754-763.

Vigdal, T.J., Kaufman, CD., Izsvak, Z., Voytas, D.F., y Ivics, Z. (2002). Common Physical Properties of DNA Affecting Target Site Selection of Sleeping Beauty and other Tc1 /mariner Transposable Elements. *Journal of molecular biology* 323, 441-452.

Walisko, O., Schorn, A., Rolfs, F., Devaraj, A., Miskey, C, Izsvak, Z., y Ivics, Z. (2008). Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 359-369.

Wang, Q., Jiang, W., Chen, Y., Liu, P., Sheng, C, Chen, S., Zhang, H., Pan, C, Gao, S., y Huang, W. (2014). In vivo electroporation of minicirde DNA as a novel method of vaccine delivery to enhance HIV-1 -specific immune responses. *Journal of virology* 88, 1924-1934.

Wang, Z., Troilo, P. J., Wang, X., Griffiths, T.G., Pacchione, S.J., Barnum, A.B., Harper, L.B., Pauley, C.J., Niu, Z., y Denisova, L, y col. (2004). Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene therapy* 11, 711-721.

Wiehe, J.M., Ponsaerts, P., Rojewski, M.T., Homann, J.M., Greiner, J., Kronawitter, D., Schrezenmeier, H., Hombach, V., Wiesneth, M., y Zimmermann, O., y col. (2007). mRNA- mediated gene delivery into human progenitor cells promotes highly efficient protein expression. *Journal of cellular and molecular medicine* 1 1, 521 -530. Wilber, A., Frandsen, J.L., Geurts, J.L., Largaespada, D.A., Hackett, P.B., y Mclvor, R.S. (2006). RNA as a source of transposase for Sleeping Beauty-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 625-630.

Wilber, A., Wangenstein, K.J., Chen, Y., Zhuo, L, Frandsen, J.L., Bell, J.B., Chen, Z.J., Ekker, S.C., Mclvor, R.S., y Wang, X. (2007). Messenger RNA as a source of transposase for sleeping beauty transposon-mediated correction of hereditary tyrosinemia type I. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 1280-1287. Williams, D.A. (2008). Sleeping beauty vector system moves toward human trials in the United States. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1515-1516.

Wu, X., Li, Y., Crise, B., y Burgess, S. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 13, 1749-1751.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ethris GmbH

<120> Sistema mejorado de transposón para la administración de genes

<130> Y2441 PCT S3

<150> EP 15 18 5515.2

<151> 2015-09-16

<160> 19

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> transposasa SB SB100X hiperactiva

<400> 1

Met Gly Lys Ser Lys Glu Ile Ser Gln Asp Leu Arg Lys Arg Ile Val

1

5

10

15

ES 2 772 709 T3

Asp Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Leu Gly Ala Ile Ser Lys Arg Leu  
 20 25 30  
 Ala Val Pro Arg Ser Ser Val Gln Thr Ile Val Arg Lys Tyr Lys His  
 35 40 45  
 5 His Gly Thr Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Ser Gly Arg Arg Arg Val Leu  
 50 55 60  
 Ser Pro Arg Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Lys Val Gln Ile Asn Pro  
 65 70 75 80  
 Arg Thr Thr Ala Lys Asp Leu Val Lys Met Leu Glu Glu Thr Gly Thr  
 10 85 90 95  
 Lys Val Ser Ile Ser Thr Val Lys Arg Val Leu Tyr Arg His Asn Leu  
 100 105 110  
 Lys Gly His Ser Ala Arg Lys Lys Pro Leu Leu Gln Asn Arg His Lys  
 115 120 125  
 15 Lys Ala Arg Leu Arg Phe Ala Thr Ala His Gly Asp Lys Asp Arg Thr  
 130 135 140  
 Phe Trp Arg Asn Val Leu Trp Ser Asp Glu Thr Lys Ile Glu Leu Phe  
 145 150 155 160  
 Gly His Asn Asp His Arg Tyr Val Trp Arg Lys Lys Gly Glu Ala Cys  
 20 165 170 175  
 Lys Pro Lys Asn Thr Ile Pro Thr Val Lys His Gly Gly Gly Ser Ile  
 180 185 190  
 Met Leu Trp Gly Cys Phe Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Leu His Lys  
 195 200 205  
 25 Ile Asp Gly Ile Met Asp Ala Val Gln Tyr Val Asp Ile Leu Lys Gln  
 210 215 220  
 His Leu Lys Thr Ser Val Arg Lys Leu Lys Gly Arg Lys Trp Val  
 225 230 235 240  
 Phe Gln His Asp Asn Asp Pro Lys His Thr Ser Lys Val Val Ala Lys  
 30 245 250 255  
 Trp Leu Lys Asp Asn Lys Val Lys Val Leu Glu Trp Pro Ser Gln Ser  
 260 265 270  
 Pro Asp Leu Asn Pro Ile Glu Asn Leu Trp Ala Glu Leu Lys Lys Arg  
 275 280 285  
 35 Val Arg Ala Arg Arg Pro Thr Asn Leu Thr Gln Leu His Gln Leu Cys  
 290 295 300  
 Gln Glu Glu Trp Ala Lys Ile His Pro Asn Tyr Cys Gly Lys Leu Val  
 305 310 315 320  
 Glu Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Thr Gln Val Lys Gln Phe Lys Gly Asn  
 40 325 330 335  
 Ala Thr Lys Tyr  
 340

<210> 2  
 45 <211> 1218  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 50 <223> Secuencia de SNIM RNA SB100XmCo que resulta de la transcripción *in vitro* de pVAXA120-SB100XmCo

<400> 2  
 55 gggagaccca agcuggcuag cguuuuaacu uaagcuuggu accgagcucg gauccaccau 60  
 gggcaagagc aaagagauca gccaggaccu gagaaagcgg aucguggacc ugcacaagag 120  
 cggcucuagc cugggcgcca ucagcaagag acuggccgug ccuagaagca gcgugcagac 180  
 60 caucgugcgg aaguacaagc accacggcac caccagccc agcuacagau cugggagaag 240  
 aagagugcug agccccaggg acgagagaac ccucgugcgc aaggugcaga ucaaccccag 300  
 aaccaccgcc aaggaccucg ugaagaugcu ggaagagaca ggcaccaagg uguccaucag 360  
 65 caccgugaag agggugcugu acagacacaa ccugaagggc cacagcgcca gaaagaagcc 420

ES 2 772 709 T3

ccugcugcag aacaggcaca agaaggccag acugagauuc gccaccgccc acggcgacaa 480

5 ggacagaacc uuuuggagaa acgugcugug gagcgacgag acaaagaucg agcuguucgg 540

ccacaacgac cacagauacg uguggcggaa gaagggcgag gccugcaagc ccaagaacac 600

caucccuacc gugaagcacg gcggaggcag caucaugcug uggggcuguu uugccgcugg 660

10 cggcacaggc gccucgcaua agaucgacgg caucauggac gccgugcagu acguggacau 720

ccugaagcag caccugaaaa ccucugugcg gaagcugaag cugggcagaa aauggguguu 780

15 ccagcacgac aacgacccca agcacaccag caagggugug gccaaguggc ugaaggacaa 840

caaagugaaa gugcugggaau ggcccagcca gagccccgac cugaacccca ucgagaaccu 900

gugggccgag cugaagaaaa gagugcgggc cagaaggccc accaaccuga cacagcugca 960

20 ccagcugugc caggaagagu gggccaagau ccacccaac uacugcggca agcuggugga 1020

aggcuacccc aagaggcuga ccaagugaa gcaguucaag ggcaacgcca ccaaguacug 1080

25 agaauucugc agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200

aaaaaaaaaa aagcggcc 1218

30 <210> 3  
<211> 1218  
<212> RNA  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Secuencia de SNIM RNA SB100XmCo(DAE) que resulta de la transcripción *in vitro* a partir de pVAXA120-SB100XmCo(DAE)

40 <400> 3

gggagaccca agcuggcuag cguuuuacu uaagcuuggu accgagcucg gauccaccau 60

gggcaagagc aaagagauca gccaggaccu gagaaagcgg aucguggacc ugcacaagag 120

45 cggcucuagc cugggcgcca ucagcaagag acuggccgug ccuagaagca gcgugcagac 180

caucgugcgg aaguacaagc accacggcac caccagccc agcuacagau cugggagaag 240

50 aagagugcug agccccaggg acgagagaac ccucgugcgc aaggugcaga ucaaccccag 300

aaccaccgcc aaggaccucg ugaagaugcu ggaagagaca ggaccaagg uguccaucag 360

caccgugaag agggugcugu acagacacaa ccugaagggc cacagcgcca gaaagaagcc 420

55 ccugcugcag aacaggcaca agaaggccag acugagauuc gccaccgccc acggcgacaa 480

ggacagaacc uuuuggagaa acgugcugug gagcgacgag acaaagaucg agcuguucgg 540

60 ccacaacgac cacagauacg uguggcggaa gaagggcgag gccugcaagc ccaagaacac 600

caucccuacc gugaagcacg gcggaggcag caucaugcug uggggcuguu uugccgcugg 660

cggcacaggc gccucgcaua agaucgacgg caucauggac gccgugcagu acguggacau 720

65 ccugaagcag caccugaaaa ccucugugcg gaagcugaag cugggcagaa aauggguguu 780

# ES 2 772 709 T3

ccagcacgcc aacgacccca agcacaccag caagguggug gccaaguggc ugaaggacaa 840  
 caaagugaaa gugcuggaau ggcccagcca gagccccgac cugaacccca ucgagaaccu 900  
 5 gugggcccag cugaagaaaa gagugcgggc cagaaggccc accaaccuga cacagcugca 960  
 ccagcugugc caggaagagu gggccaagau ccacccaac uacugcggca agcuggugga 1020  
 10 aggcuacccc aagaggcuga cccaagugaa gcaguucaag ggcaacgcca ccaaguacug 1080  
 agaaauucugc agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200  
 15 aaaaaaaaaa aagcggcc 1218  
 <210> 4  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> ITR de la unidad de transposón llamada "Lo"  
 25 <400> 4  
 tacagtgaa gtcggaagt tacatacact taag 34  
 <210> 5  
 30 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> ITR de la unidad de transposón llamada "Li"  
 <400> 5  
 tccagtgggt cagaagtta catacactaa gt 32  
 40 <210> 6  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> ITR de la unidad de transposón llamada "Ri"  
 <400> 6  
 cccagtgggt cagaagtta catacactca at 32  
 50 <210> 7  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> ITR de la unidad de transposón llamada "Ro"  
 <400> 7  
 60 tacagtgaa gtcggaagt tacatacacc ttag 34  
 <210> 8  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> ITR de la unidad de transposón llamada "DRo"  
 5 <400> 8  
 tacagttgaa gtcggaagtt tacatacacy taag 34  
 <210> 9  
 <211> 30  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> ITR de la unidad de transposón llamada "DRi"  
 15 <400> 9  
 cagtgggtca gaagtttaca tacactmart 30  
 <210> 10  
 <211> 35  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador SB-IRDR-R\_FW  
 <400> 10  
 gctgaaatga atcattctct ctactattat tctga 35  
 30 <210> 11  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador SB-IRDR-R\_RV  
 <400> 11  
 aattccctgt cttaggtcag ttagga 26  
 40 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador TERT\_FW  
 <400> 12  
 50 gacaaagtac agctcaggcg 20  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador TERT\_RV  
 60 <400> 13  
 ttcagcgtgc tcaactacga 20  
 <210> 14  
 <211> 21  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 772 709 T3

<220>  
 <223> Cebador RIR\_FW  
 5 <400> 14  
 gaatg gatg aaagaaataa a 21  
 <210> 15  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador RIR\_RV  
 15 <400> 15  
 agttacata caccttagcc 20  
 <210> 16  
 20 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda específica de RIR  
 <400> 16  
 tgggatcct aactgaccta agacagg 27  
 30 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador RPP30\_FW  
 <400> 17  
 ggtaactac agctcccagc 20  
 40 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador RPP30\_RV  
 <400> 18  
 50 ctgtctccac aagtccgc 18  
 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda específica de RPP30  
 60 <400> 19  
 tggacctgcg agcgggttct gacc 24

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema de transposón que comprende
  - 5 (a) una unidad de transposón que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) o repeticiones terminales directas (DTR) que flanquean una secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana; y
  - (b) un ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma; en donde dicho ARN que codifica para dicha transposasa
    - 10 se caracteriza porque contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados.
- 15 2. El sistema de transposón de la reivindicación 1, en donde dicha unidad de transposón de (a) está en la forma de un minicírculo.
3. El sistema de transposón de la reivindicación 1 o 2 que es un sistema de transposón *SLEEPING BEAUTY* (SB).
- 20 4. El sistema de transposón de la reivindicación 3, en donde la transposasa es la transposasa SB hiperactiva SB100X que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 o que tiene una secuencia que es por lo menos 70% idéntica a SEQ ID NO:1 y que tiene una actividad transposasa que es por lo menos 80% de la de dicha transposasa SB100X.
- 25 5. Uso de un sistema de transposón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la administración de genes *ex vivo* a una célula diana.
6. El uso de la reivindicación 5, en donde la célula diana es una célula madre hematopoyética.
7. Un método *ex vivo* para la administración de genes a una célula diana que comprende los siguientes pasos:
  - 30 (a) poner en contacto el sistema de transposón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una célula;
  - (b) cultivar dicha célula en condiciones permisivas para el cultivo de dicha célula.
- 35 8. La composición farmacéutica que comprende el sistema de transposón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. El sistema de transposón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar en terapia génica.
- 40 10. Kit que comprende
  - (a) una unidad de transposón que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) o DTR que flanquean una
    - 45 secuencia de interés a insertar en el genoma de una célula diana; y
    - (b) un ARN que codifica para una transposasa que tiene la capacidad de reconocer dichas ITR o DTR y transponer dicha secuencia de interés a dicho genoma; en donde dicho ARN que codifica para dicha transposasa se caracteriza porque contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el
      - 50 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados.
- 55 11. Una molécula de ARN que codifica para una transposasa, en donde dicho ARN que codifica para dicha transposasa se caracteriza porque contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en donde entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de uridina y entre el 5 y el 50% de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados.
12. Uso de una molécula de ARN que codifica para la transposasa como se define en la reivindicación 11 para la administración de genes *ex vivo* a una célula diana.



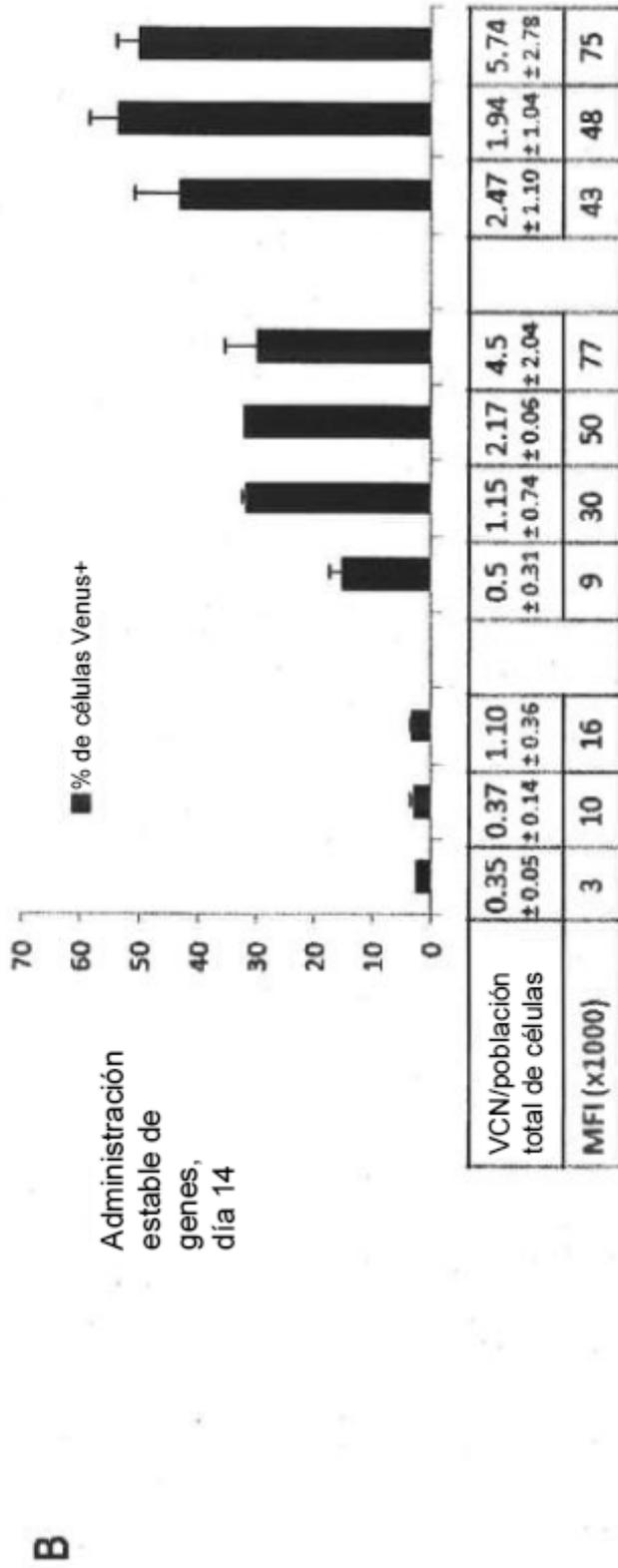


Figura 1B

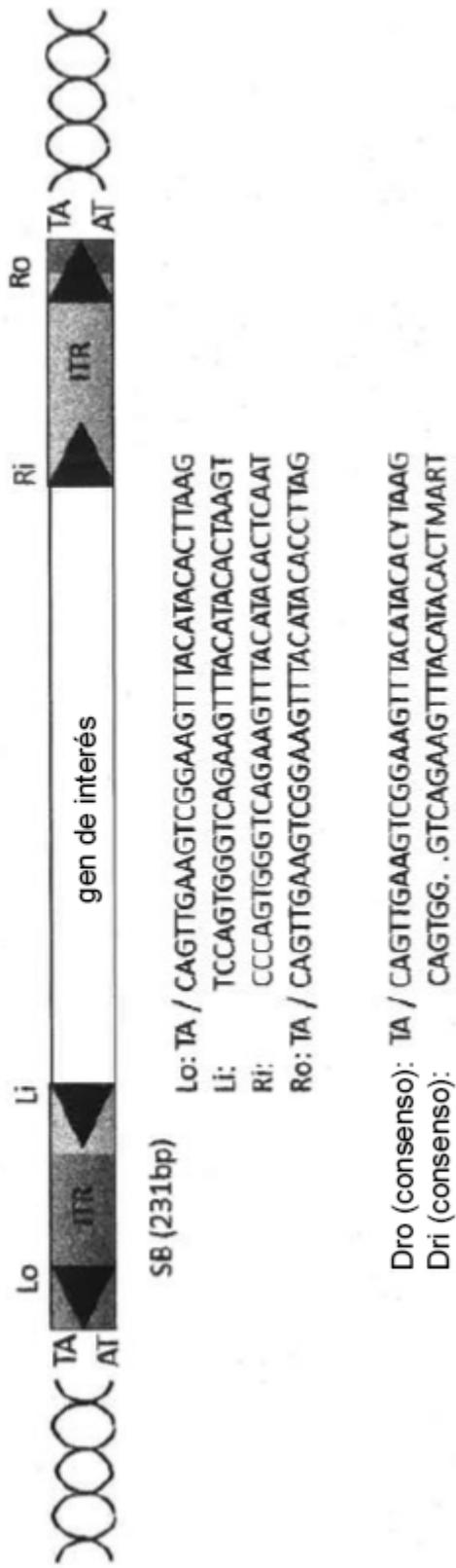


Figura 2

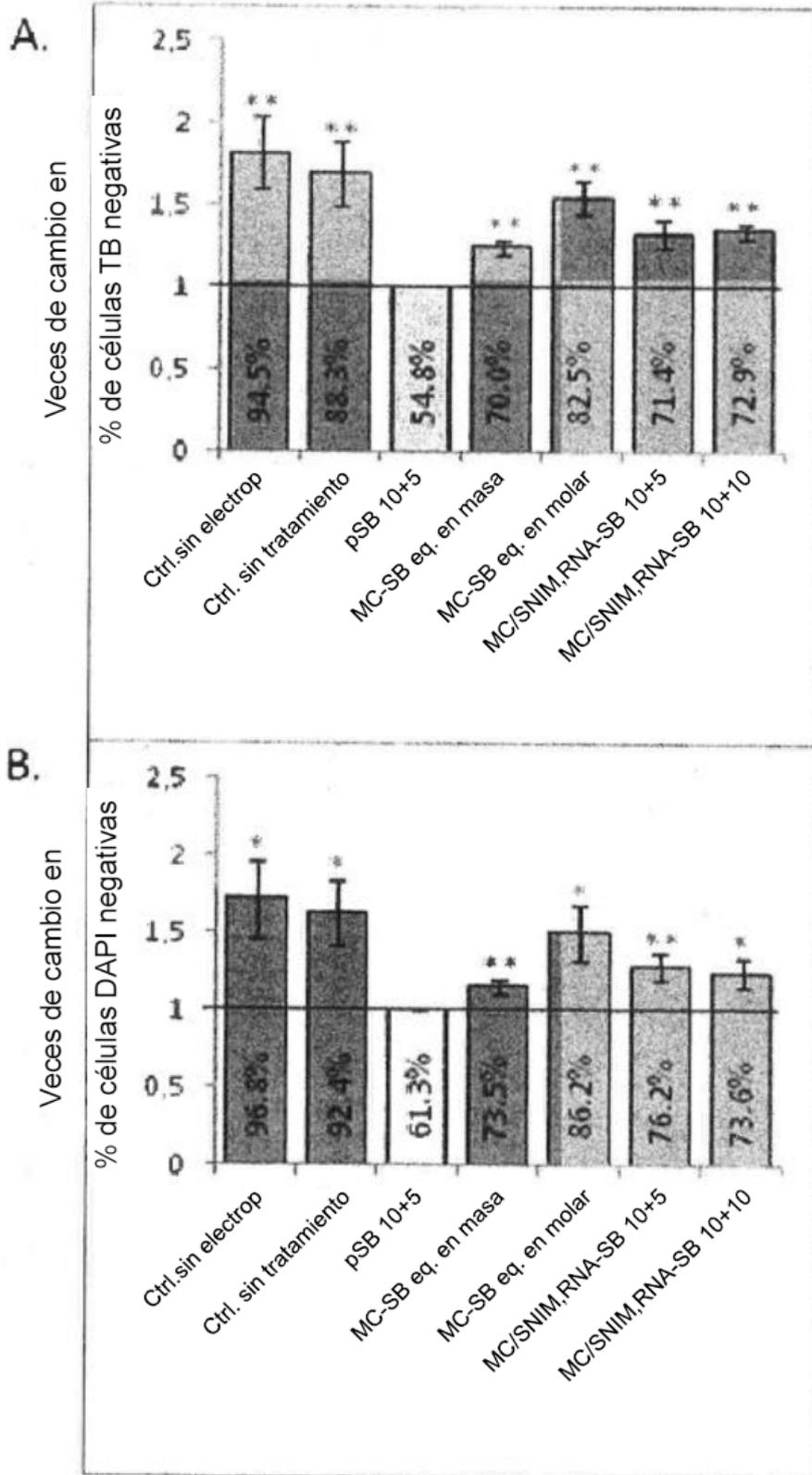


Figura 3

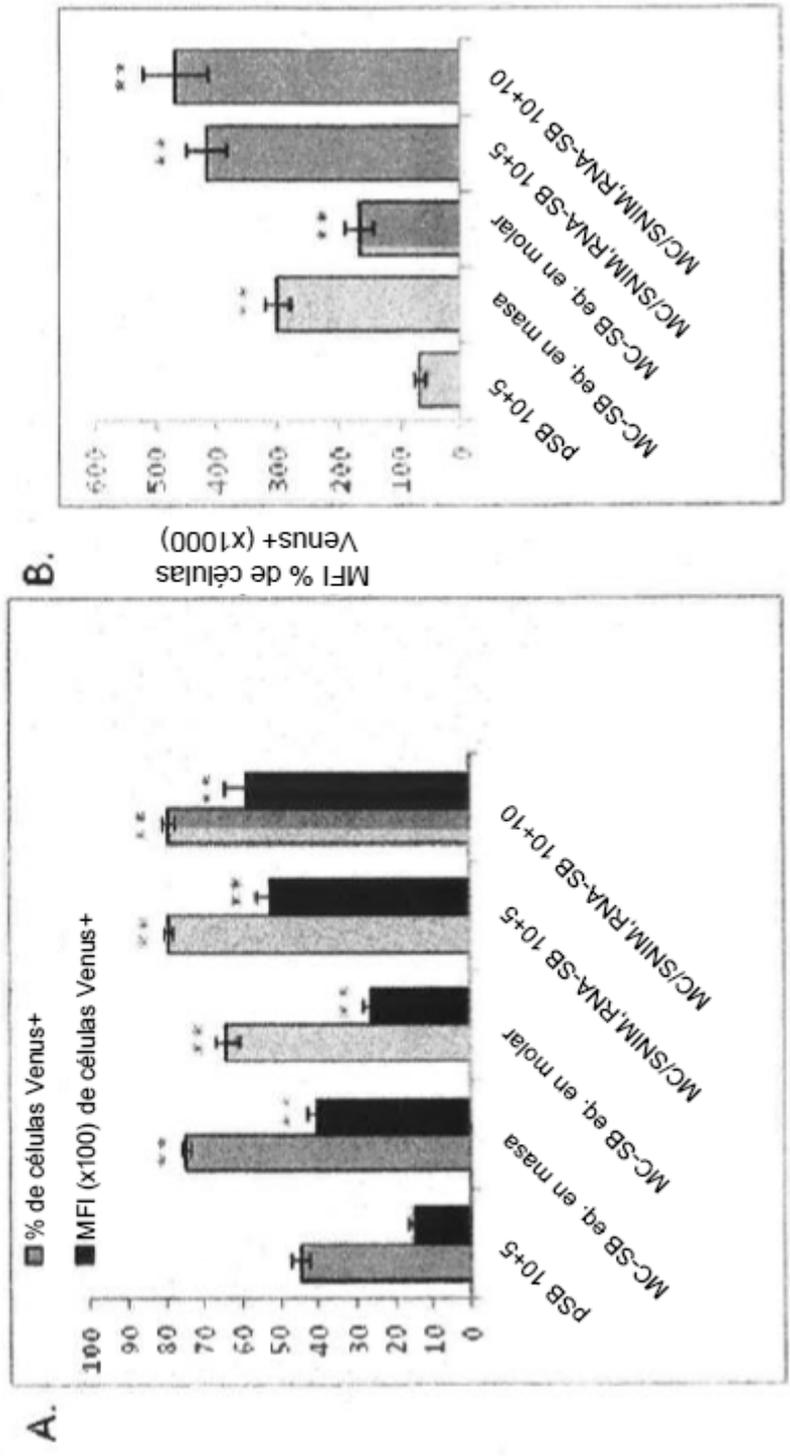
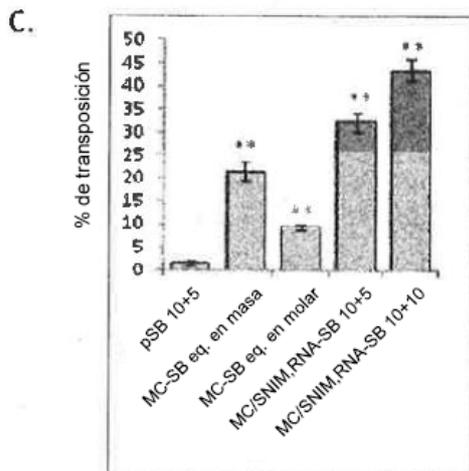
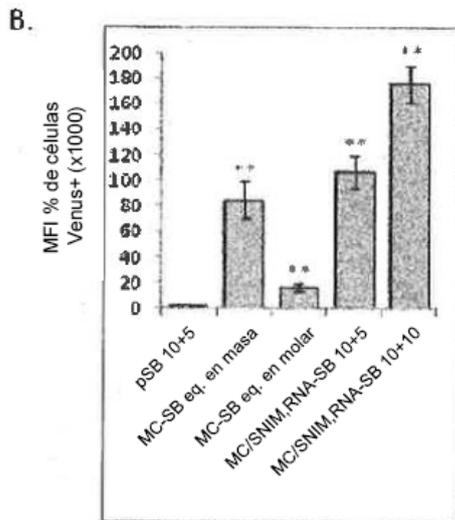
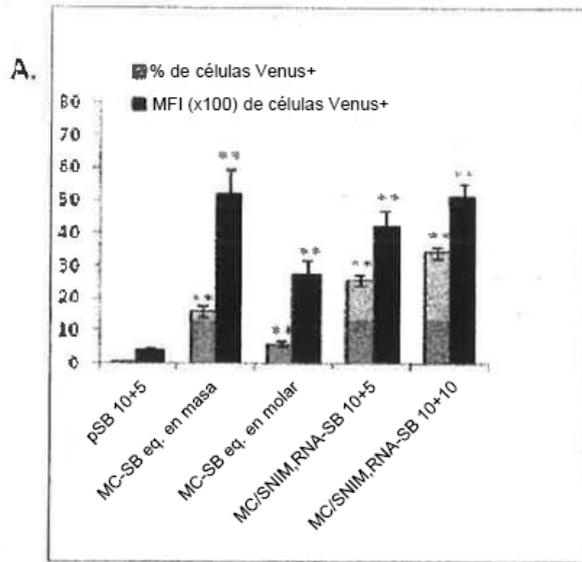


Figura 4



**Figura 5**

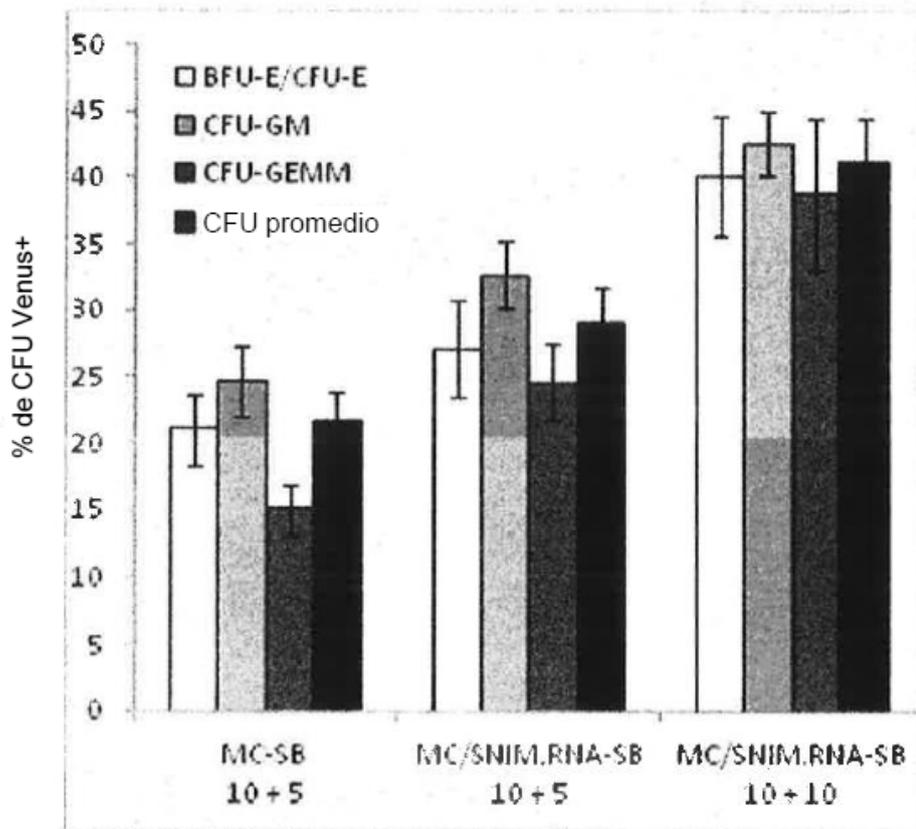
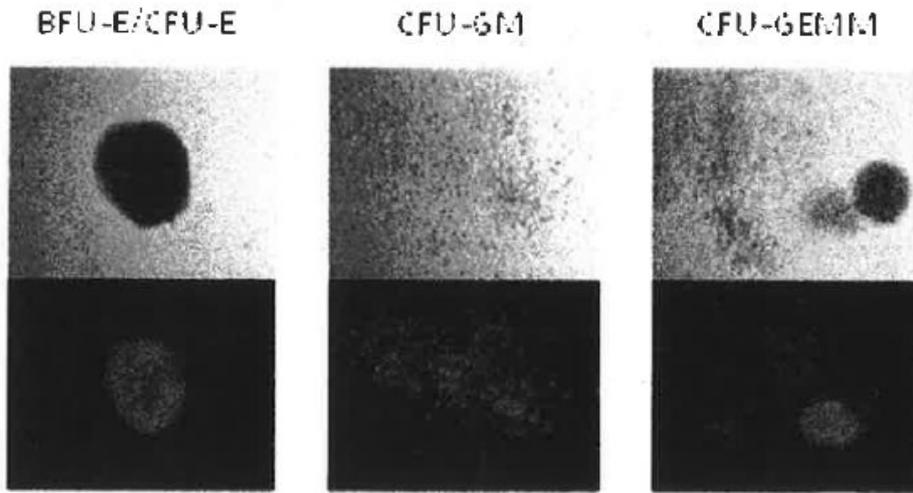


Figura 6

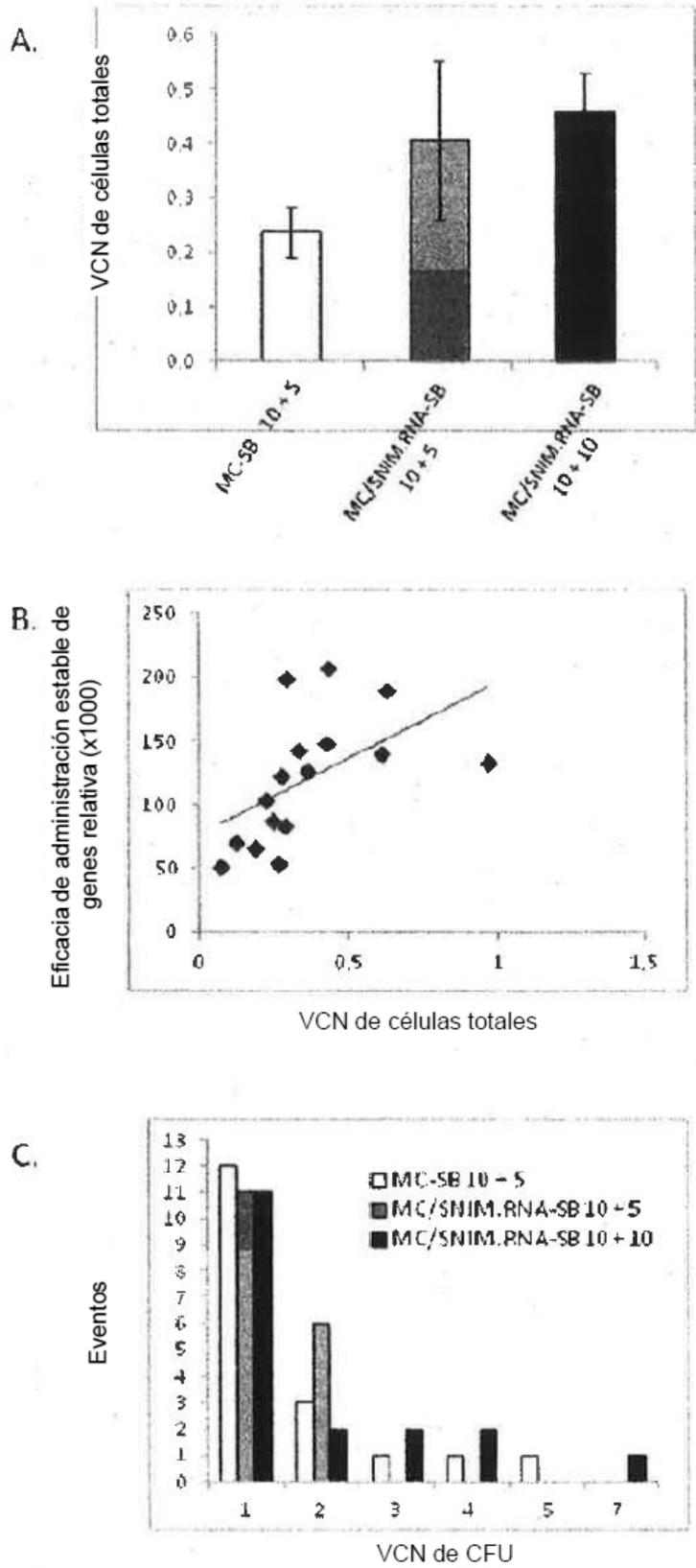


Figura 7