



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 334 087**

② Número de solicitud: 200800593

⑤ Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **29.02.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
04.03.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Jaén
OTRI-Campus Las Lagunillas, s/n - Edif. B1
23071 Jaén, ES**

⑦ Inventor/es: **Lorite Martínez, Pedro;
Palomeque Messía, Teresa Amalia;
Carrillo Ávila, José Antonio y
Muñoz López, Martín**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Vectores y usos del transposon *Mboumar*.**

⑤ Resumen:

Vectores y usos del transposon *Mboumar*.
Producción de una transposasa naturalmente activa de
Messor bouvieri de forma recombinante, construcciones
genéticas derivadas del transposon *Mboumar* necesarias
para la transgénesis y mutagénesis, y usos de las mis-
mas.

ES 2 334 087 A1

DESCRIPCIÓN

Vectores y usos del transposon *Mboumar*.

5 La presente invención se incluye en el área de biología molecular, concretamente dentro de la genética molecular, y más concretamente en el campo de estudio de los elementos genéticos móviles o transposones. Se refiere a los vectores necesarios para la construcción de herramientas genéticas basados en los transposones, y a los usos de los mismos.

Estado de la técnica anterior

10 Los transposones son secuencias de ADN que pueden moverse a diferentes posiciones dentro del genoma de una célula, un proceso denominado transposición. En general se clasifican en dos grupos:

- 15 - Transposones de Clase I o retrotransposones, inicialmente los retrotransposones se copian a sí mismos a ARN (transcripción) pero, además de transcribirse, el ARN se copia en el ADN por una transcriptasa inversa (a menudo codificada también por el transposon) e insertada de nuevo en el genoma.
- 20 - Transposones de Clase II, cuyo mecanismo de transposición no implica la formación de RNA. Generalmente se transponen por un proceso de “cortar y pegar”, mediante una enzima transposasa.

25 Las transposasas son las enzimas responsables de su movilidad y son sintetizadas por el propio transposon. *In vivo* pueden originar transposición de material genético dentro de un mismo cromosoma, entre cromosomas, e incluso entre cromosomas y material genético no cromosómico como, por ejemplo, ADN mitocondrial. Este movimiento de material genético puede originar graves disturbios en el organismo en que se produce, aunque también se sabe que ha tenido una gran importancia a lo largo de la evolución. En un principio los transposones se consideraron como “ADN basura”. Sin embargo, actualmente se piensa que pueden influir en el genoma hospedador de diferentes maneras. Así, se considera que pueden modular la expresión génica actuando como promotores, activadores, silenciadores, sitios de procesamiento alternativo o sitios indicativos de modificaciones epigenéticas. Igualmente, pueden contener genes que podrían ser incluidos en el genoma del huésped para la realización de una función celular determinada, proceso que se conoce como “domesticación molecular”. Además de todo lo anterior, debido a su existencia en copias múltiples pueden actuar como sitios de recombinación originando en el genoma duplicaciones, inversiones, deleciones o translocaciones. (Charlesworth *et al.* 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220; Kidwell MG. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63; Ivics & Izsvak 2004. Transposable elements for transgenesis and insertional mutagenesis in vertebrates: a contemporary review of experimental strategies. *Methods Mol Biol* 260: 255-276.) Recientes observaciones demuestran que los transposones pueden ser activos en células somáticas, abriendo la posibilidad de que puedan jugar un importante papel generando diversidad entre células con un mismo genoma. Concretamente, se ha considerado que esta diversidad podría ser generada por cambios en la regulación de la expresión de la transposasa que a su vez, podría afectar la regulación de la expresión génica de ciertos genes en determinadas células. Los efectos podrían ser beneficiosos (como ocurre probablemente en los casos de diferenciación de células neuronales, o en la actividad de las proteínas RAG, importantes en los procesos de recombinación que ocurren en el genoma de los linfocitos) o deletéreos (procesos cancerígenos) dependiendo del momento del desarrollo y del tipo celular (Collier and Largaespada. Transposable elements and the dynamic somatic genome. *Rewied*. 2007. *Genome Biology* 2007, **8** (Suppl 1: S5).

45 Los transposones del tipo *mariner* son secuencias capaces de moverse por el genoma que se encuentran flanqueadas por secuencias repetidas terminales invertidas (*inverted terminal repeats* ó ITRs). Codifican una única proteína, la transposasa, que uniéndose a esas ITRs escinde el *mariner* y lo integra en otro lugar del genoma. La transposasa *Mos1* cataliza el movimiento del transposón *Mos1* encontrado en *Drosophila mauritania*, el cual es, no sólo el primer elemento *mariner* aislado, sino también el primer elemento *mariner* aislado activo de forma natural. Los elementos *mariner* constituyen una numerosa familia de transposones ampliamente extendidos en el reino animal. Codifican la enzima transposasa que es el único requerimiento para su transposición. Esta enzima tiene dos dominios: el dominio N-terminal o dominio de unión al DNA y el dominio C-terminal o dominio catalítico, el cual conserva el motivo DD(34)D. En esta enzima se han identificado además otros motivos y dominios imprescindibles para su actuación. A pesar de lo mencionado, aún hay aspectos desconocidos de su actuación, cuyo conocimiento podría proporcionar grandes ventajas para su uso como vectores, además de proporcionar interesantes datos científicos; por este motivo en los últimos años se están realizando numerosos estudios en este sentido.

60 La amplia distribución de los elementos *mariner*, presentes también en humanos, y su, aparentemente, fácil transferencia horizontal entre distintos grupos de animales, implica que son capaces de funcionar en diferentes ambientes celulares, es decir, no requieren factores específicos del hospedador para llevar a cabo su transposición. Estos hechos han llevado a la realización de una serie de estudios para conseguir un vector de amplio uso en células animales. Sin embargo, la mayor parte de los elementos *mariner* que se han clonado hasta el momento son defectivos, ya que han sufrido mutaciones en la región codificante de la transposasa, por lo que son incapaces de producir transposasas funcionales, motivo que ha originado que los transposones usados actualmente como vectores sean mayoritariamente derivados de construcciones realizadas en el laboratorio, usando secuencias consenso. Esto parece deberse a un proceso denominado “inactivación vertical” (Lohe *et al.*, 1995. Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of mariner-like transposable elements. *Mol. Biol. Evol.* 12: 62-72). Aunque estos elementos son inactivos de forma

natural (al menos respecto su función transposasa), conservan relativamente su estructura, existiendo varias hipótesis al respecto. Así, puede que los elementos inactivos tengan algún efecto regulatorio, o que provengan de la introgresión reciente de un genoma a otro.

5 La importancia del uso de vectores basados en transposones en campos tan diversos como el estudio de genes implicados en el cáncer, en la generación de modelos de enfermedades humanas en ratón, en la generación de cerdos transgénicos con posibilidad de utilización como granjas farmacéuticas, en la regulación génica y diferenciación celular, en estudios de genómica funcional etc., ha llevado a la realización de numerosas investigaciones con estos vectores utilizados en diferentes organismos y en diferentes condiciones.

10 Se han desarrollado herramientas de transposición *in vivo* en varios organismos. (En la tabla 1 se expone un resumen). En la mayoría de los casos, hospedadores específicos requerían vectores especiales.

15 Las reacciones de transposición *in vivo* se llevan a cabo con independencia de las condiciones celulares o del hospedador: Generalmente se llevan a cabo con transposasas purificadas, y como dianas se pueden emplear plásmidos, fragmentos génicos, o ADN genómico aislado. En reacciones sucesivas, los plásmidos que contienen los transposones pueden ser transferidos a células hospedadoras.

20 La transposición *in vitro* ofrece muchas ventajas sobre los sistemas *in vivo* (Devine and Boeke 1994. Efficient integration of artificial transposons into plasmid targets *in vitro*: a useful tool for DNA mapping, sequencing and genetic analysis. *Nucleic Acids Res*, 22: 3765-3772; Biery *et al.* 2000. A simple *in vitro* Tn7-based transposition system with low target site selectivity for genome and gene analysis. *Nucleic Acids Res*, 28: 1067-1077), principalmente se puede evitar la interferencia con factores del hospedador. Las reacciones de transposición *in vitro* son, generalmente, más eficientes y más flexibles en la elección de las dianas en el ADN (Goryshin and Reznikoff. 1998. Tn5 *in vitro* transposition. *J Biol Chem*, 273: 7367-7374). En la tabla 2 se resumen las distintas aplicaciones de los transposones, tanto *in vitro* como *in vivo*.

30 Los autores de esta invención han descrito un MLE (*mariner-like element*) en la hormiga *Messor bouvieri*, del orden *Hymenoptera*, familia *Formicidae* (Palomeque *et al.*, Detection of a *mariner*-like element and a miniature inverted-repeat transposable element (MITE) associated with the heterochromatin from ants of the genus *Messor* and their possible involvement for satellite DNA evolution. 2006. *Gene* 371:194-205). Sin embargo, no se conoce si este MLE codifica una transposasa naturalmente activa, si al producir esta enzima de forma recombinante conservaría su posible actividad biológica, y si la construcciones genéticas llevadas a cabo con sus elementos serían útiles para la transposición *in vitro* y/o *in vivo*.

35 Puesto que la mayoría de las transposasas encontradas son inactivas, y dado el gran número de aplicaciones e interés que tienen los MLE en biotecnología, hace necesario la construcción de transposasas artificiales que sean activas, a partir de las naturales defectivas, para su empleo como herramientas genéticas. El procedimiento más empleado consiste en, a partir de copias defectuosas de las transposasas encontradas en diversos organismos de forma natural, corregir las mutaciones que inactivan la enzima mediante mutagénesis dirigida. Por tanto, encontrar una *transposasa naturalmente activa*, que facilite su producción como proteína recombinante, sin necesidad de introducir modificaciones en la secuencia aminoacídica, supondría un avance notable en este sector de la técnica.

TABLA 1

45 *Ejemplos de elementos transponibles útiles en las aplicaciones de transposones en diferentes organismos in vivo*

Organismos	Elementos
Bacteria	Mu, familia Tn3, Tn5, Tn7, Tn10, Tn916
Hongos	Elementos Ty
Nematodos	Tc1
Insectos	Elemento P, piggyBac, familia Tc1/mariner (Mos1, Himar1)
Plantas	hAT, CACTA
Vertebrados	Familia Tc1/mariner (Sleeping Beauty, minos, Himar1, Mos1), L1, Tol2, piggyBac, retrovirus.

TABLA 2

Aplicaciones de los transposones

Aplicaciones	Uso
Inactivación insercional de los genes	Detección de genes esenciales para ciertas funciones en el genoma, y posible análisis de la localización, expresión, o regulación de un gen específico.
Gene traps (inserción de un gen "reporter" en genomas)	Análisis de la regulación, expresión y función de un gen.
Huella genética	Mapeo funcional de genes, genomas o proteínas; detección de genes condicionalmente importantes en microorganismos.
Signatura-tagged mutagenesis (STM)	Detección de genes de virulencia en bacterias patógenas.
Inserción de regiones de unión para cebadores	Secuenciación de ADN.
Introducción de genes en el genoma	Generación de organismos transgénicos y líneas celulares.
Aplicaciones en ingeniería de proteínas	Generación de inserciones, proteínas de fusión, o delecciones anidadas.

Explicación de la invención

Los autores de la invención han encontrado que el MLE descrito en *Messor bouvieri* codifica la transposasa *Mboumar*, la cual, producida en el laboratorio de forma recombinante es objeto de esta solicitud de patente junto con los vectores y demás construcciones necesarias para su utilización, y es activa naturalmente. Como indicamos en diferentes puntos de esta solicitud, las restantes transposasas activas se han reconstruido en el laboratorio a partir de elementos defectivos presentes en los correspondientes genomas.

La posibilidad de contar con una transposasa naturalmente activa, facilita su utilización y la construcción de nuevos vectores adaptados a necesidades concretas de la biotecnología y sus aplicaciones.

Así pues, el uso conjunto de esta transposasa y las construcciones realizadas con las ITRs pueden constituir un sistema de transposición *in vitro* que puede ser utilizado en diversos experimentos, tales como la generación de mutaciones aleatorias. Otra posible aplicación de este sistema es la transgénesis y mutagénesis de forma aleatoria en el genoma de células procariotas o eucariotas, mediante la inserción entre las ITRs *Mboumar* de la secuencia deseada. La ventaja del uso de vectores basados en este tipo de elementos transponibles es su versatilidad, ya que no son específicos de hospedador, puesto que su único requerimiento es la presencia de la transposasa que ellos mismos producen.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido recombinante, de ahora en adelante péptido de la invención, que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 1 recoge la secuencia de aminoácidos de la enzima transposasa aislada de la especie *Messor bouvieri*.

Cuando comparamos la secuencia de la transposasa *Mboumar* (de *Messor bouvien*) con la secuencia de otras transposasas aisladas en otras especies, es evidente que existen ciertas regiones en que están más conservadas que otras, y lo mismo ocurre con el transposón. Esta información puede ser indicativa de que esas zonas son cruciales para mantener la estructura o función de la proteína. Así, los ITRs de diferentes subfamilias de elementos *mariner* (Himar1, Hpmar1, Hsmar2, Mos1, Csmar1, Ammar1,..), así como *Mboumar*, presentan conservadas diferentes regiones (Langin *et al.*, 1995. The transposable element Impala, a fungal member of the Tc1-*mariner* superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 246,19-28 (Lampe *et al.*, 2001. Loss of transposase DNA interaction may underlie the divergence of *mariner* family transposable elements and the ability of more than one *mariner* to occupy the same genome. *Mol. Biol. Evol.* 18, 954-961) Tanto las regiones activas que determina la especificidad de las transposasas como las cisteínas conservadas entre las que se establecen puentes disulfuro, importantes para la conformación de la proteína, estarán más conservadas entre ambas proteínas, mientras que en otras regiones la divergencia es más aparente. En concreto, estas enzimas presentan dos dominios: el dominio N-terminal o dominio de unión al DNA y el dominio C-terminal o dominio catalítico, el cual conserva el motivo DD(34)D (Robertson HM. 1996. Members of the pogo superfamily of DNA-mediated transposons in the human genome. *Mol Gen Genet* 252: 761-766., Lohe *et al.* 1997. Mutations in the *mariner* transposase: the D,D(35)E consensus sequence is non-functional. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1293-1297). En esta enzima se han identificado además otros motivos y dominios imprescindibles para su actuación (Petrokovski & Henikoff 1997. A helix-turn-helix DNA-binding motif predicted for transposases of DNA transposons. *Mol Gen Genet* 254: 689-695., Hickman *et al.* 2005. Molecular architecture of a eukaryotic DNA transposase. *Nat Struct Mol Biol* 12: 715-721).

Por todo lo dicho anteriormente, puede esperarse que la identidad global de las transposasas homólogas a *Mboumar*, a nivel de los aminoácidos, y más concretamente a nivel de la secuencia aminoacídica que se recoge en la SEQ ID NO: 1, sea de un 70% o mayor, y más preferiblemente de un 80% o mayor y más preferiblemente de un 90, o un 95% o mayor. La correspondencia entre la secuencia aminoacídica de la(s) transposasa(s) putativa(s) y la secuencia de otras transposasas se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia aminoacídica procedente de la transposasa homóloga putativa, y la secuencia aminoacídica que se recoge en la SEQ ID NO: 1 de esta memoria.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos del péptido recombinante presenta una identidad de, al menos, un 70% con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos de un 80%, más preferiblemente al menos de un 90% y aún más preferiblemente al menos de un 95%.

Péptidos homólogos a la transposasa *Mboumar* de *Messor bouvieri* (SEQ ID NO: 1) mantendrían su función biológica. Por ejemplo, la actividad transposasa incluye su actividad de unión a los elementos IRT y/o RDs (“*Deleted regions*”), la escisión de las secuencias de ácidos nucleicos entre estos elementos IRT y/o RDs y su actividad de inserción de secuencias en una diana específica.

Más preferiblemente, estos péptidos homólogos a la transposasa *Mboumar* han sido modificados para potenciar la actividad biológica de dicha enzima. Así, por ejemplo, se pueden sustituir aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 para potenciar dicha actividad. Los métodos para producir tales secuencias derivadas afines, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, o escisión enzimática y/o ligación de ácidos nucleicos, son bien conocidos en la técnica, como lo son los métodos para determinar si el ácido nucleico así modificado tiene una homología significativa con la secuencia que se está considerando, por ejemplo, por hibridación. En otra realización más preferida de este aspecto de la invención el péptido recombinante es homólogo a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto de la invención el péptido recombinante de la invención se usa como transposasa. En otro aspecto de la invención el péptido recombinante de la invención se usa como herramienta genética.

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o polinucleótido recombinante, de aquí en adelante polinucleótido de la invención, que se traduce al péptido codificado por la SEQ ID NO: 1, y que se selecciona de la lista que comprende:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a), o
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la secuencia de aminoácidos a la que se traduce el polinucleótido de la invención, presenta una identidad de, al menos un 60% con la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos a la que se traduce el polinucleótido de la invención, presenta una identidad de, al menos un 80%, más preferiblemente, de un 90% y más preferiblemente de un 95%, con la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto de la invención, el polinucleótido de la invención se usa para producir, en cantidades hasta ahora no disponibles, el péptido de la invención.

Otro aspecto de la invención se relaciona con una construcción genética, de aquí en adelante, primera construcción genética de la invención o construcción de ayuda, que permite la expresión del péptido de la invención, tal y como se ha descrito anteriormente, en cantidades hasta ahora no disponibles. La producción en cantidades superiores a las actualmente disponibles permitiría el uso del péptido de la invención como herramienta genética.

Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética, de aquí en adelante, segunda construcción genética de la invención o construcción donante, que comprende las regiones ITR reconocidas por el péptido de la invención, entre las que se inserta un polinucleótido de interés. Adicionalmente, puede contener un marcador, como por ejemplo, pero sin limitarse a ello, un gen de resistencia a un antibiótico.

En otro aspecto de la invención se describe un método para la obtención de un péptido recombinante de la invención que consiste en poner la construcción genética descrita anteriormente en un medio de reacción adecuado.

Este método incluye los vectores de clonación y expresión que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Tales vectores de expresión incluyen secuencias de control adecuadas, como por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos y virus (comprendiendo bacteriófagos y virus eucarióticos), de acuerdo con procedimientos bien conocidos y documentados en

el estado de la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados en el estado de la técnica. Los vectores virales adecuados incluyen baculovirus y también adenovirus y virus vacunales. Muchos otros vectores virales también están descritos en el estado de la técnica.

5 Se conoce una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas para la expresión, o en una línea germinal o en células somáticas, para formar animales transgénicos. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en la bibliografía.

10 Las células hospedantes eucarióticas o procarióticas transformadas o transfectadas, que contienen una molécula de ácido nucleico conforme a la invención, como se definió anteriormente, también forman parte de este aspecto de la invención.

15 La expresión de las secuencias (igual u homóloga) codificadoras del péptido de la invención, utilizando una serie de técnicas y sistemas de expresión conocidos, incluyendo la expresión en células procarióticas tales como *E. coli* y en células eucarióticas tales como levaduras o el sistema de baculovirus-célula de insecto o células de mamíferos transformadas y en animales transgénicos y plantas.

20 En una realización particular de este aspecto de la invención, como vector donde se introduce el ORF de *Mboumar*, se empleó el plásmido de fusión pMal-c2X (New England Biolabs), junto con el gen *malE* de *Escherichia coli* que codifica la proteína de unión a la maltosa (MBP: *maltose-binding protein*). Cuando se induce el promotor tac de este vector en presencia de IPTG se va a expresar la proteína de fusión *transposasa Mboumar* + MBP que va a ser purificada gracias a la afinidad que presenta MBP por la amilosa y la maltosa.

25 Para controlar la inserción de moléculas de ácidos nucleicos utilizando el transposón *Mboumar*, se han desarrollado sistemas duales de transposición. Un sistema dual funciona poniendo en contacto, al menos, dos construcciones genéticas (que pueden ser por ejemplo, dos plásmidos), o mediante la cotransfección o introducción de éstas en la misma célula: la construcción donante y la de ayuda. La donante es una construcción de expresión del gen (promotor-gen-terminador) o un polinucleótido de interés, flanqueado por dos ITR (5' ITR promotor-gen-terminador-3' ITR ó 5' ITR-polinucleótido de interés-marcador-3' ITR ó 5' ITR-polinucleótido de interés-3' ITR) y la de ayuda contiene la *transposasa Mboumar* bajo el control de un promotor. Adicionalmente, la transposición se puede llevar a cabo de forma masiva *in vitro*, produciendo la *transposasa* recombinante de forma exógena, y poniéndola en contacto, posteriormente, con la construcción donante.

35 El contacto o la cotransfección de ambas construcciones (donante y de ayuda) en una misma célula, provoca primero la expresión de la *transposasa Mboumar* y después la *transposasa Mboumar* corta la construcción donante por las 2 ITR y pega toda la construcción en el genoma de la célula huésped, o de una tercera construcción genética receptora, que puede ser, por ejemplo, un plásmido (plásmido receptor). Para poder cortar y pegar las ITR de la construcción donante, la transposición mediada por *Mboumar* no sólo requiere una *transposasa Mboumar* completa y activa en la construcción de ayuda, sino también 2 sitios de unión para la *transposasa* en las ITR en la construcción donante.

40 Otro aspecto de la invención se relaciona con un método para la transposición *in vitro* o *in vivo* que consiste en poner en contacto el péptido recombinante de la invención, con la construcción genética que comprende el polinucleótido de interés.

45 En una realización preferida de este aspecto de la invención el método para la transposición *in vitro* o *in vivo* se usa para la generación de mutaciones aleatorias. En una realización aún más preferida de la invención, el método para la transposición *in vitro* o *in vivo* se usa para la generación de transgénesis y mutagénesis aleatoria en el genoma de células procariotas o eucariotas.

50 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la invención para la generación de mutaciones aleatorias, tanto *in vitro* como *in vivo*. Más preferiblemente, el péptido de la invención se usa para la generación de transgénesis y mutagénesis aleatoria en el genoma de células procariotas o eucariotas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

55 Mediante mutagénesis insercional inducida por la *transposasa Mboumar* se podría identificar la función de determinados genes, identificar oncogenes y/o para introducir mutagénesis masiva. Para aumentar el número de inactivaciones insercionales, las primeras construcciones ITR insertadas en el genoma en una primera generación se pueden activar masivamente mediante la introducción de *transposasas* exógenas. La inactivación de genes por mutagénesis insercional con ITR resultaría en la obtención de algunos mutantes con la alteración del fenotipo deseado. En este proceso, los genes inactivados están además marcados con las ITR y sus secuencias pueden entonces recuperarse y los genes identificarse. Una vez que los genes implicados se han identificado se podrían utilizar métodos tradicionales de selección genética para obtener líneas con el carácter deseado.

60 El término "péptido recombinante que comprende" tal y como se emplea en esta memoria, hace referencia a que el péptido incluye la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, pudiendo ésta integrarse con otros aminoácidos y péptidos, incluso péptidos de fusión, siempre que conserve su función como enzima *transposasa*, y que es objeto de la presente invención. También hace referencia a secuencias de aminoácidos que codifiquen un péptido homólogo al que codifica la SEQ ID NO: 1.

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los aminoácidos de dos o más proteínas o secuencias aminoacídicas. Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80%, mantendrán la función transposasa de dicho péptido, que es objeto de la presente invención.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999)). Adicionalmente, el algoritmo de Smith Waterman debe usarse para determinar el grado de identidad de dos secuencias.

El término “fragmento o derivado” de un péptido, “que posea actividad transposasa” se refiere a fragmentos o péptidos derivados de la transposasa *Mboumar* en su estado natural que carecen de algún o algunos aminoácidos, y que aún actúan transponiendo ADN. Alternativamente, este término también se refiere a péptidos derivados de la transposasa *Mboumar* natural, donde se ha cambiado uno o más aminoácidos, eliminados, añadidos, o menos preferentemente, que ha sufrido inversiones o duplicaciones. Tales modificaciones se hacen, preferentemente, mediante tecnología de ADN recombinante. Otras modificaciones pueden hacerse, también, mediante alteraciones químicas de la transposasa. El péptido resultante (o los fragmentos derivados del mismo) pueden ser producidos recombinantemente, y retener características idénticas, o esencialmente idénticas a la transposasa natural *Mboumar*.

Un “péptido recombinante” tal y como se entiende en esta memoria, es aquel que se obtiene a partir de la expresión de un “polinucleótido recombinante”.

El término “polinucleótido recombinante” tal como se usa aquí supone un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético, o sintético que, en virtud de su origen o manipulación: (1) no está asociado con el total o una porción de un polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido diferente de aquel al que está unido en la naturaleza, o (3) no ocurre en la naturaleza.

El término “polinucleótido” como aquí se usa se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien ribonucleótidos o bien desoxirribonucleótidos. Este término sólo se refiere a la estructura primaria de la molécula. Así, este término incluye ADN de cadena doble o sencilla, al igual que ARN de cadena doble o sencilla. También incluye todos los tipos de modificaciones conocidas (marcadores conocidos en la técnica, metilación, remates, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidas como, por ejemplo, aquellas con uniones sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, triésteres de fósforo, amidatos de fósforo, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, tioatos de fósforo, ditioatos de fósforo, etc.), aquellos que contienen mitades colgantes, como, por ejemplo, proteínas (incluyendo por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), al igual que formas no modificadas del polinucleótido.

El término “herramienta genética” tal y como se define en esta memoria, hace referencia a las herramientas empleadas en ingeniería genética para diversas aplicaciones, y engloba herramientas de genética molecular, de genética cuantitativa, genética de poblaciones, etc... En particular, en el contexto de la presente invención, hace referencia a una herramienta útil para la transposición *in vitro*, o para la transgénesis y mutagénesis de forma aleatoria, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleótida dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotes, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

“Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

ES 2 334 087 A1

Un “marco de lectura libre” (ORF) es una región de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido; esta región puede representar una porción de una secuencia codificadora o una secuencia codificadora completa.

Una “secuencia codificadora” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a ARNm y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a ARNm, ADNc, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

El término “*Mboumar* natural”, tal y como se emplea en esta memoria, hace referencia al péptido o proteína codificada por la secuencia nucleotídica denominada Mboumar-9, correspondiente a la SEQ ID NO: 1, clonada a partir del genoma de la hormiga *Messor bouvieri*.

El término “*Mboumar* mutante” significa en esta descripción, la proteína resultante de la modificación de la proteína “*Mboumar* natural”, preferentemente para potenciar la actividad biológica de dicha proteína.

Un “hospedador” o “célula hospedadora” como se emplea en esta memoria se refiere a un organismo, célula o tejido que sirve como diana o recipiente del elemento transponible para insertarse dentro ellos mismos. Una célula hospedadora u hospedador puede indicar, también, una célula u hospedador que expresa una proteína recombinante de interés donde la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión conteniendo el gen de interés.

El término “transgénico” se usa en el contexto de la presente invención para describir animales o plantas en los que se ha incorporado de forma estable una secuencia de ADN no propio introducido por un elemento *mariner* (*mariner-like element* MLE) en sus cromosomas de tal forma que puede pasar de manera estable a las generaciones sucesivas de animales transgénicos descendientes. En tales circunstancias, el organismo transgénico inicial se conoce como “fundador”. El animal “fundador” debe tener el ADN no propio o transgén incorporado en todas sus células o en una proporción suficiente para que su progenie establezca por herencia el transgénico. Cuando el transgén está presente sólo en una porción de células, el organismo se refiere como una quimera. La presente invención también se extiende a animales que incorporan el transgén estable o directamente en sus cromosomas y los cuales expresan el transgén en sus células somáticas sin pasar el transgén a su descendencia. En concreto, estos animales servirían como modelos genéticos, para, como por ejemplo, pero sin limitarse a estos usos, identificar y estudiar la función de los genes, detectar oncogenes, obtención de productos biofarmacéuticos,... Se han descrito modelos similares obtenidos por construcciones genéticas derivadas de transposones en ratones y peces cebra.

Se entiende por “transgénesis” en esta memoria al proceso de transferir ADN no propio a un organismo, que pasa de esta manera a denominarse “transgénico”.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Plásmido pITR y plásmido pITR-Kn. El vector pITR se obtiene a partir del plásmido donado con el *mariner* Mboumar-9 pGEMT easy vector (Promega) por la eliminación del gen de resistencia a la ampicilina (Ampr) y el origen de replicación (ori). Igualmente se han eliminado las dianas EcoRI del pGEMT easy vector.

Figura 2. Sitio de donación del plásmido pITR con una región de corte de la Apo I.

Figura 3. Procedimiento de eliminación de las dianas para EcoRI del pGEMT easy vector. A- Digestión con *E. coli* y generación de extremos protuberantes. B- Rellenado de los extremos protuberantes con Klenow y generación de extremos romos. C- Ligado de los dos extremos con ligasa T4.

Figura 4. Esquema del ensayo de la transposición *in vitro*.

Exposición detallada de modos de realización

En la hormiga *Messor bouvieri* se han donado varias copias diferentes de elementos *mariner*. El análisis de la secuencia nucleotídica de estos *mariner* indica que podrían dar lugar a transposasas funcionales, ya que la región codificante de la transposasa no presenta mutaciones que generen codones de parada, y la proteína que originaría conserva la mayor parte de los motivos que se suponen son necesarios para la actividad de la transposasa.

A partir de uno de los clones de *mariner* obtenidos (Mboumar-9) se ha aislado la región codificante de la transposasa, que se ha introducido en un vector de expresión para llevar a cabo su síntesis en *E. coli*. Esta transposasa se ha denominado *Mboumar*. Mediante experimentos de transposición *in vitro* se ha determinado que esta transposasa es activa, siendo capaz de movilizar al elemento *mariner* del cual procede.

Se han realizado varias construcciones mediante la eliminación parcial de la región central del *mariner*, manteniendo las ITRs. La región eliminada se ha sustituido por un gen marcador, que en este caso es el gen de resistencia a la kanamicina (Kn). Mediante transposición *in vitro* se ha comprobado que esta construcción (ITR-gen Kn-ITR) puede ser movilizada por la transposasa *Mboumar*, y, por tanto, cualquier otra secuencia colocada entre estas ITRs.

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la actividad del péptido recombinante de la invención y la efectividad de las construcciones genéticas y de dicho péptido en la transgénesis *in vitro*.

a) Purificación de la transposasa *Mboumar*

La producción *in vitro* de la proteína se realiza mediante la introducción de su región codificante (ORF) en un vector de expresión. De los múltiples vectores de expresión existentes en el mercado se ha usado en este caso el plásmido de fusión pMal-c2X (New England Biolabs).

El ORF de *Mboumar* se introduce en el vector pMal-c2X aguas abajo del gen *malE* de *Escherichia coli* que codifica la proteína de unión a la maltosa (MBP: maltose-binding protein). Cuando se induce el promotor *tac* de este vector en presencia de IPTG se va a expresar la proteína de fusión transposasa *Mboumar* + MBP que va a ser purificada gracias a la afinidad que presenta MBP por la amilosa y la maltosa.

El ORF del transposón *Mboumar* es amplificado a partir del clon *Mboumar-9* (Palomeque *et al.* 2006. Detection of a *mariner*-like element and a miniature inverted-repeat transposable element (MITE) associated with the heterochromatin from ants of the genus *Messor* and their possible involvement for satellite DNA evolution. Gene 371:194-205) con dos primers que incorporan dos dianas de corte para las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, lo cual va a permitir introducirlo en fase en el polylinker de pMal-c2X. Una vez se obtiene el plásmido que incluye la ORF de *Mboumar* en el lugar correcto de donación en pMal-c2X, se introduce por transformación en bacterias *E. coli* de la cepa Rosetta 2. Con una de las colonias positivas obtenidas se inoculan 100 ml de cultivo líquido de medio LB con ampicilina (Amp), y se incuba en agitación a 37°C hasta que se obtiene una A = 0,5. A continuación se añade IPTG a una concentración final de 0,1 mM y se mantiene en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga el cultivo a 5.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en 10 ml de buffer HSG (Hepes pH=7,5 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, DTT 2 mM y un 10% de glicerol) al que se le añade inhibidor de la proteasa. Los 100 ml de cultivo se introducen en una prensa francesa y se someten las bacterias a una presión de 1.000 Psi. El lisado obtenido se centrifuga a 15.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se hace pasar por una columna con 1 ml de amilasa (previamente lavada con Buffer HSG) donde va a quedar retenida la proteína de fusión. Una vez a pasado todo el sobrenadante a través de la matriz de amilosa, esta se vuelve a lavar con Buffer HSG. Finalmente, para separar la proteína se añade 1 ml de Buffer HSG con maltosa a una concentración de 10 mM, se diluye en buffer A (Hepes pH=7,5 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 2 mM y un 5% de glicerol) y se hace pasar por una columna de intercambio iónico (FPLC) tomándose varias fracciones. Estas fracciones se migran en un gel SDS-Page y se selecciona la que presente una proporción mayor de proteína completa con respecto a la incompleta. A la fracción seleccionada se le añade glicerol (concentración final del 10%), se alícuota y se guarda a -80°C para su posterior uso. La concentración de proteína se cuantifica mediante el método de Bradford.

La secuencia de la transposasa *Mboumar-9*, obtenida a partir de la secuencia de ADN del *marinarMboumar-9*, se recoge en la SEQ ID NO: 1.

b) Fundamento de la transposición *in vitro*

Para determinar la actividad *in vitro* de la transposasa es necesario el desarrollo de dos vectores, uno el donador y otro el receptor. El Plásmido Donador contendrá la secuencia que se desea movilizar, que debe estar flanqueada por las ITRs del transposón *Mboumar*. El Plásmido Receptor puede ser cualquier otro donde pueda ser detectada la inserción de la secuencia localizada entre las dos ITRs que aporta el plásmido donador.

Durante la transposición *in vitro* la transposasa *Mboumar* va a reconocer las ITRs que se localizan en el plásmido donador. La transposasa realizará un corte en los extremos de estas ITRs e integrará este fragmento de DNA en un dinucleótido TA (que sufrirá una duplicación durante el proceso) del plásmido receptor. Sin embargo, es también posible que se produzca integración en un sitio distinto del propio plásmido donador. Para evitar este inconveniente el plásmido donador deberá ser incapaz de replicarse en las bacterias que se transformarán con la reacción de la transposición *in vitro*.

c) Diseño de los vectores para la transposición *in vitro*

Se han construido dos plásmidos donadores: pITR, que presenta los extremos del elemento *mariner* y por tanto sus ITRs, y el pITR-Kn, derivado del anterior, pero al que se le ha incorporado el gen de resistencia a kanamicina (gen *Knr*) (Fig. 1).

ES 2 334 087 A1

c.1. Plásmido pITR

Para la construcción de este vector se parte del plásmido *Mboumar-9* que contiene el elemento *mariner Mboumar-9* clonado en el plásmido pGEMT easy vector (Promega). La primera modificación que se realiza sobre el plásmido es la eliminación del gen de resistencia a la ampicilina (Ampr) y el origen de replicación (ori). Para ello se ha digerido el plásmido con los enzimas Scal y Accl, liberándose así la mayor parte del gen Ampr y el ori. Este fragmento se sustituye por el origen de replicación R6K, el cual va a permitir a este plásmido replicarse únicamente en bacterias pir+, pero no en cepas pir-, que van a ser aquellas transformadas con la reacción de transposición.

Posteriormente el plásmido se digiere con las enzimas de restricción MscI y NdeI (digestión parcial), y se unen los extremos generados en el vector por ligación. Estas enzimas van a liberar la región central del *mariner* dejando solo 173 pb de los extremos, en los que se encuentran las dos ITRs. En esta región se localiza una secuencia diana para el enzima Apol, que puede ser utilizada para insertar una secuencia de DNA (Fig. 2). Sin embargo, esta enzima también es capaz de cortar en las dianas para EcoRI que se encuentran en el vector pGEM-T, a ambos lados del inserto, por lo que es necesario eliminarlas.

Para eliminar las dianas EcoRI se digiere el plásmido con este enzima, generándose dos fragmentos, uno con el inserto correspondiente al *mariner* y otro con el vector. Este enzima genera extremos protuberantes que son rellenados con ayuda del enzima Klenow, generándose así fragmentos con extremos romos que vuelven a ser ligados, degenerando así la diana para EcoRI (Fig. 3), quedando la diana Apol entre las dos ITRs como diana única para este enzima en el plásmido (Fig. 2)

c.2. Plásmido pITR-Kn

El plásmido pITR-Kn es derivado del pITR al cual se le ha insertado el gen de resistencia a la kanamicina (gen Knr) en la diana de Apol (Fig. 1)

c.3. Plásmido receptor

Como plásmido receptor se puede usar cualquier otro que confiera resistencia a un antibiótico diferente de la kanamicina y que sea capaz de replicarse en bacterias pir-. Para los ensayos de transposición *in vitro* se ha usado el propio vector pGEMT Easy Vector (Promega).

d) Ensayo de transposición *in vitro* (Figura 4)

- Elementos necesarios para la transposición *in vitro*:
 - Plásmido donador (pITR-Kn).
 - Plásmido receptor (pGEM-T).
 - Transposasa *Mboumar* purificada.
 - Tampón de reacción: Es el tampón en el que se reúnen las condiciones necesarias para que se lleve a cabo la transposición por parte de la transposasa *Mboumar*.
- Reacción de transposición *in vitro*:
 - Plásmido donador: 9 μ M.
 - Plásmido receptor: 9 μ M.
 - Transposasa *Mboumar*: 10 nM.
 - Buffer de reacción 1x:
 - Glicerol: 10%.
 - Hepes (pH=7.9): 25 mM.
 - BSA: 12, 5 μ g/ μ l.
 - DTT: 2 mM.
 - NaCl: 100 mM.
 - MgCl₂: 10 mM.

ES 2 334 087 A1

Esta reacción se incuba a 28°C durante toda la noche. Durante este período la transposasa escinde el gen *Kn^r* junto a las ITRs que lo flanquean y lo integra en dinucleótido TA del plásmido receptor (o del plásmido donador). La movilización de esta secuencia al plásmido receptor generará un plásmido que conferirá resistencia a la kanamicina y la ampicilina, y que será capaz de replicarse en bacterias *pir*-.

5

A continuación se transforman bacterias competentes *pir*-(DH5 α) con 8 μ l de la reacción de transposición y del control negativo (sin transposasa). La mitad del volumen de la transformación con la reacción de transposición se siembra en placas de LB con kanamicina y ampicilina, y la otra mitad en placas con solo ampicilina. El mismo volumen es el que se va a sembrar de la transformación con el control negativo en una placa LB+ ampicilina+ kanamicina.

10

En las placas con solo ampicilina podrán crecer todas aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido receptor original o con la inserción del gen *Kn^r*, ya que el plásmido receptor contiene el gen *Amp^r*.

15

En las placas con ampicilina y kanamicina sólo podrán crecer aquellas bacterias que posean el plásmido receptor con la inserción del gen *Kn^r*, siempre y cuando la integración se haya producido fuera del gen *Amp^r* y del origen de replicación (*ori*). La integración en cualquiera de estos sitios daría lugar a bacterias no viables, ya que la integración en el gen *Amp^r* haría que las bacterias no fuesen resistentes a la ampicilina, y la integración en el *ori* impediría la replicación del plásmido receptor dentro de la bacteria.

20

Las bacterias que hayan incorporado el plásmido donador (con o sin el gen *Kn^R*) no sobrevivirán, ya que este plásmido no es capaz de replicarse en las bacterias *pir*-DH5 α .

- Cálculo de la Eficiencia de Transposición:

25

La eficiencia con la que la transposasa *Mboumar* ha llevado a cabo la transposición en las condiciones descritas es de 10^{-3} . Esta se calcula dividiendo en número de Plásmidos Receptores transformados con el gen *Kn^R* integrado entre el número total de Plásmidos Receptores transformados.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

5 2. Péptido recombinante según la reivindicación 1 cuya secuencia de aminoácidos presenta, al menos, una identidad del 70% con la SEQ ID NO: 1.

10 3. Péptido recombinante según la reivindicación 1 que presenta una identidad de, al menos, un 80% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

4. Péptido recombinante según la reivindicación 1 que presenta una identidad de, al menos, un 90% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

15 5. Péptido recombinante según la reivindicación 1 que presenta una identidad de, al menos, un 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

6. Péptido recombinante homólogo al péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

20 7. Polinucleótido aislado, que se traduce a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y se selecciona de la lista que comprende:

a. moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

25 b. moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a), ó

30 c. moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

para su uso en la producción del péptido recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

35 8. Polinucleótido según la reivindicación 7, donde la secuencia aminoacídica a la que se traduce presenta una identidad de, al menos un 70% con la SEQ ID NO: 1.

9. Polinucleótido según la reivindicación 7, donde la secuencia aminoacídica a la que se traduce presenta una identidad de, al menos un 80% con la SEQ ID NO: 1.

40 10. Polinucleótido según la reivindicación 7, donde la secuencia aminoacídica a la que se traduce presenta una identidad de, al menos un 90% con la SEQ ID NO: 1.

45 11. Polinucleótido según la reivindicación 7, donde la secuencia aminoacídica a la que se traduce presenta una identidad de, al menos un 95% con la SEQ ID NO: 1.

12. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7-11, que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

50 13. Uso del péptido recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o un fragmento o derivado del mismo, como transposasa.

14. Uso del péptido recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, como herramienta útil para la transposición *in vitro*, o para la transgénesis y mutagénesis de forma aleatoria, tanto *in vitro* como *in vivo*.

55 15. Uso del péptido recombinante según la reivindicación 14, para la generación de mutaciones aleatorias *in vitro*.

16. Uso del péptido recombinante según la reivindicación 14, para la generación de transgénesis y mutagénesis aleatoria *in vitro*, en el genoma de células procariotas o eucariotas.

FIGURAS

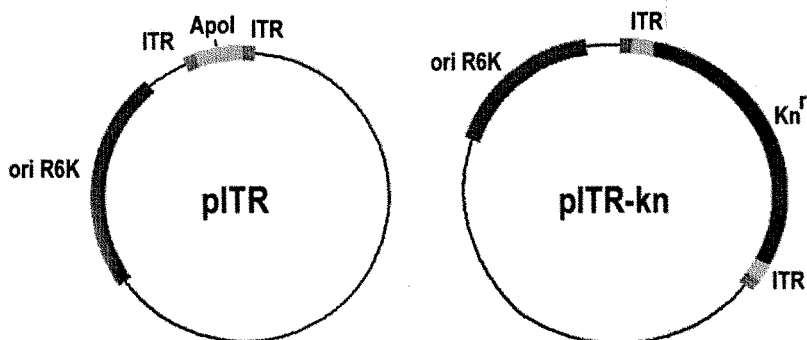


FIG. 1

ITR		
<u>CCAGGTGTGTCGGTAATTCCTTTCCGGTTTTT</u>	CCGGCAGATGTCAGCCATAAGTATG	60
ApoI		
V		
AAATGTTATGATTTGATACACCAATACTTTGAATAAAT	<u>AAATTT</u> GAACTATCCATTCTAA	120
ITR		
GTAACGTGTTTTCTTTAACGAA	<u>AAAAACCGGAAAAGAATTACCGACACTCCTGG</u>	173

FIG. 2

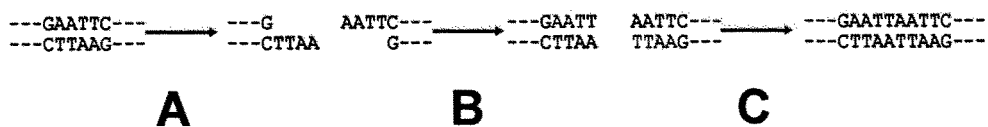


FIG. 3

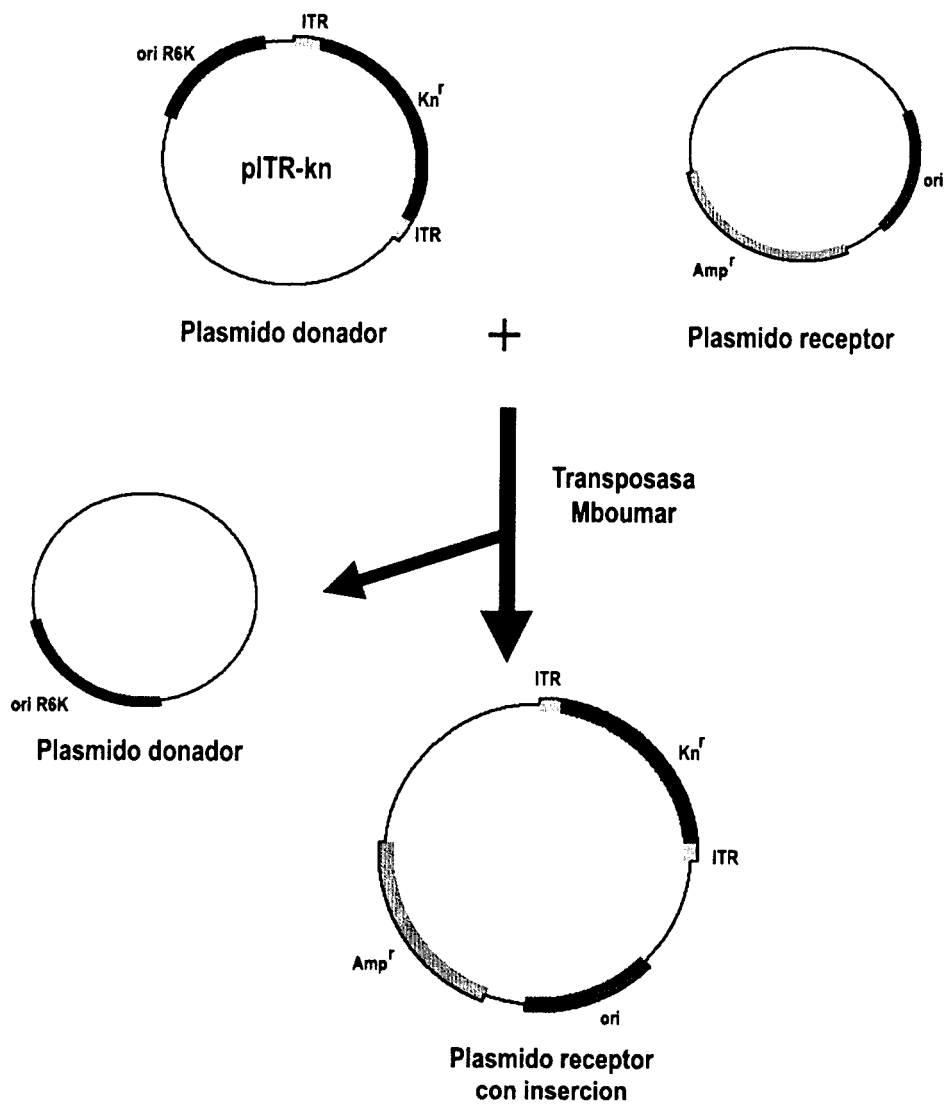


FIG. 4

ES 2 334 087 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE JAEN
UNIVERSIDAD DE JAEN

5

<120> vectores y usos del transposon Mboumar

<130> ES1881.1

10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.4

15

<210> 1

<211> 345

<212> PRT

20

<213> *Messor bouvieri*

<400> 1

25

Met Ser Ser Phe Val Pro Glu Asn Val His Leu Arg His Ala Leu Leu
1 5 10 15

30

Phe Leu Phe His Gln Lys Lys Arg Ala Ala Glu Ser His Arg Leu Leu
20 25 30

Val Glu Thr Tyr Gly Glu His Ala Pro Thr Ile Arg Thr Cys Glu Thr
35 40 45

35

Trp Phe Arg Gln Phe Lys Cys Gly Asp Phe Asn Val Gln Asp Lys Glu
50 55 60

40

Arg Pro Gly Arg Pro Lys Thr Phe Glu Asp Ala Glu Leu Gln Glu Leu
65 70 75 80

Leu Asp Glu Asp Ser Thr Gln Thr Gln Lys Gln Leu Ala Glu Lys Leu
85 90 95

45

Asn Val Ser Arg Val Ala Ile Cys Glu Arg Leu Gln Ala Met Gly Lys
100 105 110

50

Ile Gln Lys Met Gly Arg Trp Val Pro His Glu Leu Asn Asp Arg Gln
115 120 125

55

Met Glu Asn Arg Lys Ile Val Ser Glu Met Leu Leu Gln Arg Tyr Glu
130 135 140

Arg Lys Ser Phe Leu His Arg Ile Val Thr Gly Asp Glu Lys Trp Ile
145 150 155 160

60

Tyr Phe Glu Asn Pro Lys Arg Lys Lys Ser Trp Leu Ser Pro Gly Glu
165 170 175

65

Ala Gly Pro Ser Thr Ala Arg Pro Asn Arg Phe Gly Arg Lys Thr Met
180 185 190

ES 2 334 087 A1

Leu Cys Val Trp Trp Asp Gln Ile Gly Val Val Tyr Tyr Glu Leu Leu
 195 200 205
 5
 Lys Pro Gly Glu Thr Val Asn Thr Asp Arg Tyr Arg Gln Gln Met Ile
 210 215 220
 10
 Asn Leu Asn Cys Ala Leu Ile Glu Lys Arg Pro Gln Tyr Ala Gln Arg
 225 230 235 240
 15
 His Asp Lys Val Ile Leu Gln His Asp Asn Ala Pro Ser His Thr Ala
 245 250 255
 20
 Lys Pro Val Lys Glu Met Leu Lys Ser Leu Gly Trp Glu Val Leu Ser
 260 265 270
 25
 His Pro Pro Tyr Ser Pro Asp Leu Ala Pro Ser Asp Tyr His Leu Phe
 275 280 285
 30
 Ala Ser Met Gly His Ala Leu Ala Glu Gln His Phe Ala Asp Phe Glu
 290 295 300
 35
 Glu Val Lys Lys Trp Leu Asp Glu Trp Phe Ser Ser Lys Glu Lys Leu
 305 310 315 320
 40
 Phe Phe Trp Asn Gly Ile His Lys Leu Ser Glu Arg Trp Thr Lys Cys
 325 330 335
 45
 50
 55
 60
 65
 Ile Glu Ser Asn Gly Gln Tyr Phe Glu
 340 345



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 087

② Nº de solicitud: 200800593

③ Fecha de presentación de la solicitud: **29.02.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 15/55** (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PALOMEQUE T. et al. Detection of a mariner-like element and a miniature inverted-repeat transposable element (MITE) associated with the heterochromatin from ants of the genus <i>Messor</i> and their possible involvement for satellite DNA evolution. <i>Gene</i> . 2006, Vol 371, páginas 194-205, todo el documento, especialmente página 201, figura 5.	1-16
A	WO 2007063033 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 07.06.2007, resumen; página 5, línea 3 - página 9, línea 29; página 18, reivindicación 1.	1-16
A	WO 2004078981 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 16.09.2004, resumen; página 11, línea 15 - página 14, línea 18; página 48, reivindicación 20.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.02.2010

Examinador
Mª D. García Grávalos

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 14-16	SÍ
	Reivindicaciones 1-13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PALOMEQUE T. et al. Gene. 2006, Vol 371, páginas 194-205.	2006
D02	WO 2007063033 A1	07-06-2007
D03	WO 2004078981 A1	16-09-2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un péptido recombinante que contiene la secuencia definida como SEQ ID NO: 1 (reivindicaciones 1-6); así como un polinucleótido que codifica para esta secuencia (reivindicaciones 7-12). Se refiere también al uso de dicho péptido como transposasa y herramienta genética para generación de transgénesis y mutagénesis aleatorias en células procariotas y eucariotas (reivindicaciones 13-16)

El documento D01 divulga un MLE (mariner-like-element), denominado Mboumar, y un nuevo MITE (miniatura inverted-repeat transposable element), denominado IRE-130, procedentes de ADN satélite de la hormiga *Messor bouvieri*. Se refiere al aislamiento del transposón Mboumar, y a su transcripción como enzima transposasa, cuyas respectivas secuencias están depositadas en GenBank con número de acceso AJ781769-AJ781772 (ver todo el documento, especialmente página 200, apartado 3.3; página 201, figura 5)

El documento D02 divulga una transposasa, procedente de un elemento mariner de la subfamilia mauritiana, y a su producción por una célula huésped procariota (ver resumen; página 5, línea 3 - página 9, línea 29; página 18, reivindicación 1)

El documento D03 divulga transposasas mutantes, hiperactivas, no fosforilables, procedentes de elementos mariner; así como las secuencias de nucleótidos que codifican estas transposasas. Se refiere también a un método de producción de estas enzimas y a su uso para transposiciones in vitro o in vivo (ver resumen; página 11, línea 15 - página 14, línea 18; página 48, reivindicación 20)

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-16**

El objeto técnico de la presente solicitud es un péptido recombinante que contiene la secuencia definida como SEQ ID NO: 1 y un polinucleótido que codifica para esta secuencia. Se refiere también al uso de dicho péptido como transposasa y herramienta genética para generación de transgénesis y mutagénesis aleatorias en células procariotas y eucariotas.

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa el péptido que corresponde a la SEQ ID NO: 1 de la presente solicitud y a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica esta proteína definida en la Base de Datos GeneBank como transposasa.

Según lo expuesto en el documento D01 la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-13 carece de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Las reivindicaciones 14-16 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Hoja adicional

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 14-16

La diferencia entre este documento y el objeto técnico de las reivindicaciones de la solicitud radica en el uso de dicho péptido como herramienta genética para producir transgénesis y mutagénesis.

Sin embargo, dado que ambas secuencias se encuentran en D01 y también en GeneBank, registradas con número de acceso AJ781770.1, e identificadas como transposón y correspondiente transposasa, se considera que sería obvio para un experto en la materia su uso para producir transgénesis y mutagénesis, ya que constituye una actividad biológica propia de las transposasas.

En consecuencia, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 14-16 carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documento D02 y D03, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.