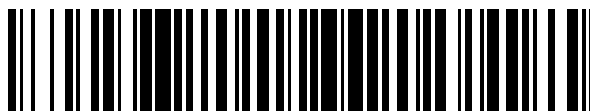


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 892**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2012 E 12178529 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2692865**

54 Título: **Identificación mediada por trasposición de proteínas de unión o funcionales específicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2015

73 Titular/es:

**NBE-THERAPEUTICS LLC (100.0%)
Technology Parc Basel, Hochbergerstrasse 60C
4057 Basel, CH**

72 Inventor/es:

GRAWUNDER, ULF

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 528 892 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

Identificación mediada por trasposición de proteínas de unión o funcionales específicas

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

(a) Tecnologías para la identificación de proteínas de unión y funcionales específicas

10 El descubrimiento de proteínas específicas de diana, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, es de interés comercial significativo, ya que la selección de proteínas funcionales o proteínas de unión altamente selectivas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, tiene un alto potencial para el desarrollo de nuevas entidades biológicas (NBE) con nuevas propiedades terapéuticas que se integran muy específicamente, o interfieren con procesos biológicos, y por lo tanto se predice que presentan perfiles de efectos secundarios menores que las nuevas entidades químicas (NCE) convencionales. A este respecto, particularmente el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, altamente específicos de diana, y productos terapéuticos basados en anticuerpos, han allanado el camino para terapias completamente nuevas con eficacia mejorada. Como consecuencia, los anticuerpos monoclonales terapéuticos representan el segmento de crecimiento más rápido en el desarrollo de nuevos fármacos durante la última década, y en la actualidad generan aproximadamente 50.000 millones de dólares americanos en ingresos globales, lo que representa un porcentaje significativo del mercado global total de los fármacos. Página adicional 1a.

25 Por lo tanto, hay mucha demanda de tecnologías eficaces e innovadoras, que permitan el descubrimiento de proteínas altamente terapéuticas, pero también bien toleradas, en particular productos terapéuticos basados en anticuerpos.

30 Para identificar una proteína con una funcionalidad deseada o una propiedad de unión específica, como sucede para anticuerpos, se requiere generar, expresar funcionalmente y explorar grandes colecciones diversas, o bibliotecas de proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, con respecto a propiedades funcionales deseadas o especificidad de unión a diana. Se han desarrollado varias tecnologías durante últimos los veinte años, que permiten la expresión de diversas bibliotecas de proteínas bien en células hospedadoras, o bien en partículas virales y de fago y métodos para su exploración de alto rendimiento y/o selección de una propiedad funcional deseada, o fenotipo de unión.

35 En Kempeni, Ann Rheum Dis 1999, 58 (sup. I) 170-2, se analizan los resultados preliminares de ensayos clínicos tempranos con anticuerpo monoclonal anti-TNF alfa completamente humano D2E7.

40 Además, Urban *et al.*, Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Nº 4 analiza la presentación de fragmentos de Fv monocatenarios expresados en la superficie de partículas retrovirales por fusión con una proteína de envoltura retroviral y selección de agentes de unión de fragmentos Fv monocatenarios seleccionando partículas retrovirales para una proteína de unión deseada. No está relacionado con la presentación de anticuerpos de longitud completa en la superficie de células de mamífero.

45 Las tecnologías del estado de la técnica, convencionales, para conseguir identificación de agentes de unión específicos de diana o proteínas con propiedades funcionales deseadas incluyen, por ejemplo, presentación de fagos, presentación retroviral, presentación bacteriana, presentación de levadura y diversas tecnologías de presentación de células de mamífero, en combinación con unión a superficie sólida (selección) y/u otras técnicas de enriquecimiento. Todas estas tecnologías están abarcadas por diversas patentes y solicitudes de patente pendientes.

50 Aunque se han establecido sistemas de presentación de fagos y procariotas y están ampliamente adoptados en la industria biotecnológica y en la academia para la identificación de agentes de unión específicos de diana, incluyendo fragmentos de anticuerpo (Hoogenboom, Nature Biotechnology 23, 1105-1116 (2005)), padecen diversas limitaciones, incluyendo la incapacidad de expresar versiones de longitud completa de proteínas mayores, incluyendo anticuerpos de longitud completa, la falta de la modificación post-traducciona apropiada, la falta de plegamiento apropiado por chaperonas de vertebrados y, en el caso de anticuerpos, una combinación de cadena pesada y ligera forzada artificialmente. Por lo tanto, en el caso del descubrimiento de anticuerpos por estos métodos, se requiere el "cambio de formato" a anticuerpos de longitud completa y expresión en células de mamífero. Debido a las limitaciones anteriormente mencionadas esto da como resultado con frecuencia anticuerpos con propiedades biofísicas desfavorables (por ejemplo baja estabilidad, tendencia a agregarse, afinidad reducida), que limitan el potencial terapéutico y diagnóstico de dichas proteínas. Esto, por un lado, conduce a tasas de desgaste significativas en el desarrollo de moléculas candidatas generadas por estos métodos y, por otro lado, requiere un esfuerzo significativo para corregir las desventajas biofísicas y moleculares en estas proteínas para desarrollo farmacológico corriente abajo adicional.

Por lo tanto, se han desarrollado tecnologías de descubrimiento de proteínas y anticuerpos usando sistemas de expresión de células eucariotas inferiores (por ejemplo, levadura) y, más recientemente, también de mamíferos para la identificación de proteínas con propiedades deseadas, ya que estas tecnologías permiten (i) la expresión de proteínas mayores, de longitud completa, incluyendo anticuerpos de longitud completa, (ii) modificación post-traduccional mejor o normal y (iii) en el caso de anticuerpos formación de pares de cadena pesada-ligera apropiada (Beerli y Rader, *mAbs* 2, 365-378 (2010)). Esto selecciona además proteínas con propiedades biofísicas favorables que tienen un mayor potencial en el desarrollo farmacológico y uso terapéutico.

Aunque sería más deseable la expresión y exploración de proteínas de células de vertebrados, debido a que las células de vertebrados (por ejemplo, células CHO de hámster, HEK-293 humanas o DT40 de pollo) son sistemas de expresión preferidos para la producción de proteínas terapéuticas mayores, tales como anticuerpos, estas tecnologías se asocian también en la actualidad con varias limitaciones, que han conducido a una adopción lenta de estas tecnologías en la academia y la industria.

En primer lugar, las células de vertebrados no se modifican genéticamente de forma tan eficaz y estable como, por ejemplo, las células procariotas o eucariotas inferiores como levadura. Por lo tanto, sigue siendo un reto generar bibliotecas de proteínas basadas en células de vertebrados suficientemente diversas (complejas), de las que puedan identificarse candidatos con propiedades deseadas o afinidades de unión mayores. En segundo lugar, para aislar eficazmente proteínas con propiedades deseadas, se requieren habitualmente ciclos por iteraciones de enriquecimiento celular. La expresión de vertebrados por transfección transitoria de plásmidos (Higuchi *et al* *J. Immunol. Methods* 202, 193-204(1997)), o sistemas de expresión viral transitorios, como virus sindbis o vaccinia (Beerli *et al.* *PNAS* 105, 14336-14341 (2008), y documento WO02102885) no permiten múltiples ciclos de selección celular requerida para enriquecer eficazmente proteínas altamente específicas, y estos métodos se restringen por lo tanto a la exploración de bibliotecas pequeñas, pre-enriquecidas, de proteínas o requieren ciclos de aislamiento de virus/re-infección celular tediosos.

Para conseguir una expresión estable de proteínas de unión y anticuerpos de células de vertebrados, que permitan múltiples ciclos de selección basándose en el acoplamiento de genotipo-fenotipo estable, se han desarrollado tecnologías, que utilizan recombinasas específicas (sistema de recombinasa flp/frt, Zhou *et al.* *mAbs* 5, 508-518 (2010)), o vectores retrovirales (documento WO2009109368). Sin embargo, la recombinación flp/frt es un sistema de baja eficacia para la integración estable de genes en genomas de células hospedadoras de vertebrados y por lo tanto, de nuevo, solamente aplicable a bibliotecas pequeñas, preseleccionadas, o la optimización de candidatos de proteínas o anticuerpos seleccionados.

En comparación con el sistema de recombinasa flp/frt, los vectores retrovirales permiten una modificación genética estable más eficaz de células hospedadoras de vertebrados y la generación de bibliotecas celulares más complejas. Sin embargo, (i) se restringen solamente a líneas celulares permisibles seleccionadas, (ii) representan un riesgo para la seguridad biológica, cuando se utilizan células humanas, (iii) los vectores de expresión retroviral están sujetos a mutagénesis no deseada de las secuencias de bibliotecas debido a transcripción inversa de baja fidelidad, (iv) los vectores retrovirales no permiten la integración de casetes de expresión genómica con estructura de intrón/exón intacta, debido al corte y empalme del genoma retroviral antes del empaquetamiento del vector en partículas retrovirales, (v) los retrovirus están sujetos a recombinación homóloga incontrolable y desfavorable de secuencias de bibliotecas durante el empaquetamiento de los genomas virales, (vi) están sujetos a silenciamiento retroviral y (vii) requieren un procedimiento tedioso de dos etapas de transfección de células de empaquetamiento/infección de célula hospedadora. Todas estas limitaciones representan retos y limitaciones significativos, e introducen complejidades significativas para la utilidad de los enfoques basados en vectores retrovirales en la generación de bibliotecas de células de vertebrados de alta calidad/alta complejidad para descubrimiento de proteínas específicas de diana o anticuerpos eficaz.

Por lo tanto, existe claramente una necesidad de una tecnología más eficaz, más controlable y sencilla que permita la generación de bibliotecas basadas en células de vertebrados de alta calidad y altamente complejas que expresen diversas bibliotecas de proteínas incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos de los que pueden aislarse proteínas con propiedades de unión y/o función altamente específicas y altas afinidades.

(b) Transposasas/transposición:

Los transposones, o elementos transponibles (TE), son elementos genéticos con la capacidad para integrarse de forma estable en genomas de células hospedadoras, un proceso que se denomina transposición (Ivics *et al.* *Mobile DNA* 1, 25 (2010)). Los TE ya los postuló en los años 50 Barbara McClintock en estudios genéticos con maíz, pero los primeros modelos funcionales para transposición se han descrito para TE bacterianos al final de los años 70 (Shapiro, *PNAS* 76, 1933-1937 (1979)).

Entre tanto está claro que los TE están presentes en el genoma de todos los organismos, y la secuenciación genómica ha revelado que aproximadamente el 45 % del genoma humano deriva de transposones (International Human Genome Sequencing Consortium *Nature* 409: 860-921 (2001)). Sin embargo, a diferencia de los invertebrados, en los que se han identificado TE funcionales (o autónomos) (Fig. 1a), los seres humanos y la

mayoría de los vertebrados superiores no contienen TE funcionales. Se ha planteado la hipótesis de que la presión selectiva evolutiva contra el potencial mutagénico de los TE condujo a su inactivación funcional hace millones de años durante la evolución.

5 Los TE autónomos comprenden ADN que codifica una enzima transposasa localizada entre dos secuencias de repetición terminal invertidas (ITR), que se reconocen por la enzima transposasa codificada entre las ITR y que pueden catalizar la transposición del TE en cualquier secuencia de ADN bicatenario (FIG. 1a). Hay dos clases diferentes de transposones: clase I, o retrotransposones, que se movilizan mediante un intermedio de ARN y un mecanismo de "copia y pega" (FIG. 2b), y clase II, o transposones de ADN, que se movilizan mediante escisión-integración, o mecanismo de "corta y pega" (FIG. 2a) (Ivics *et al.* Nat. Methods 6, 415-422(2009).

15 Los transposones bacterianos, eucariotas inferiores (por ejemplo de levadura) y de invertebrados parecen ser en gran medida específicos de especie, y no pueden usarse para la transposición eficaz de ADN en células de vertebrados. Solamente después de haberse reconstruido artificialmente un primer transposón activo por redistribución de secuencia de TE inactivos de peces, que se denominó por lo tanto "*sleeping beauty*" (Ivics *et al.* Cell 91, 501-510 (1997)), se hizo posible conseguir con éxito la integración de ADN por transposición en células de vertebrados, incluyendo células humanas. *Sleeping beauty* es un transposón de ADN de clase II que pertenece a la familia de Tc1/mariner de transposones (Ni *et al.* Briefings Funct. Genomics Proteomics 7, 444-453 (2008)). Entre tanto, se han identificado transposones funcionales adicionales o se han reconstruido de diferentes especies, incluyendo *Drosophila*, rana e incluso genomas humanos, que se ha mostrado que permiten toda la transposición de ADN en genomas de células hospedadoras de vertebrados y también humanas (FIG. 3). Cada uno de estos transposones tiene ventajas y desventajas que están relacionadas con la eficacia de transposición, estabilidad de expresión, capacidad de carga genética, etc.

25 Hasta la fecha, no se han desvelado en la técnica anterior tecnologías mediadas por transposones para la expresión de bibliotecas diversas de proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, en células hospedadoras de vertebrados para el aislamiento de proteínas de unión funcional, específicas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos.

30 **Breve resumen de la invención**

El método como se caracteriza en las reivindicaciones y se desvelan en el presente documento describe una nueva tecnología que ofrece una eficacia, flexibilidad, utilidad y velocidad sin precedentes para el descubrimiento y optimización de polipéptidos que tienen una especificidad de unión y/o funcionalidad deseadas, incluyendo moléculas de unión a antígeno tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos, para fenotipos funcionales y/o de unión deseados. El nuevo método se basa en construcciones transponibles y diversas bibliotecas de ADN clonadas en vectores transponibles y su transfección en células hospedadoras por expresión transitoria conjunta de una enzima transposasa funcional. Esto asegura una introducción eficaz, estable de los vectores de expresión basados en transposones en células hospedadoras de vertebrados en una etapa, que pueden después explorarse con respecto a un fenotipo funcional o de unión deseado de las proteínas expresadas, después de lo cual las secuencias codificantes relevantes de las proteínas expresadas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, pueden identificarse por clonación convencional y técnicas de secuenciación de ADN.

45 En una realización, la invención se dirige en general a un método para identificar un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad deseada, que comprende:

- (i) generar una colección diversa de polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, en el que dichos polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un polipéptido dispuesto entre primera y segunda secuencias de repeticiones terminales invertidas que se reconocen por y son funcionales con al menos una enzima transposasa;
- (ii) introducir la colección diversa de polinucleótidos de (i) en células hospedadoras;
- (iii) expresar al menos una enzima transposasa funcional con dichas secuencias de repeticiones terminales invertidas en dichas células hospedadoras de modo que dicha colección diversa de polinucleótidos se integre en el genoma de la célula hospedadora para proporcionar una población de células hospedadoras que expresan dicha colección diversa de polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades;
- (iv) explorar dichas células hospedadoras para identificar una célula hospedadora que expresa un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad deseada; y
- (v) aislar la secuencia polinucleotídica que codifica dicho polipéptido de dicha célula hospedadora.

60 En una realización preferida, los polinucleótidos son moléculas de ADN. En una realización, la colección diversa de polinucleótidos comprende una secuencia de unión a ligando de un receptor o una secuencia de unión a diana de una molécula de unión. En una realización preferida, los polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica una molécula de unión a antígeno, tal como un dominio VH o VL de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo que son de longitud completa (es decir, que incluyen la región constante). En ciertas realizaciones, los polinucleótidos pueden comprender una secuencia que codifica una región

tanto VH como VL, o cadenas tanto pesadas como ligeras de anticuerpo. En otra realización, los polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un dominio Fv monocatenario o uno Fab.

5 En una realización, la colección diversa de polinucleótidos se genera sometiendo las secuencias del gen de región V a PCR en condiciones de mutación, por ejemplo, por amplificación por PCR de repertorios de región V de linfocitos B de vertebrados. En otra realización, la colección diversa de polinucleótidos se genera por síntesis génica (por ejemplo, por selección aleatoria de secuencias que codifican un polipéptido que tiene especificidad de unión y/o funcionalidad conocidas). En una realización útil, la colección diversa de polinucleótidos comprende vectores plasmídicos. En otra realización útil, la colección diversa de polinucleótidos comprende amplicones de PCR de ADN
10 bicatenario. Los vectores plasmídicos pueden comprender una secuencia que codifica un gen marcador, tal como un marcador fluorescente, un marcador de superficie celular o un marcador seleccionable. La secuencia del gen marcador puede estar cadena arriba o cadena abajo de la secuencia que codifica el polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad, pero entre las secuencias de repeticiones terminales invertidas. Como alternativa, la secuencia del gen marcador puede estar cadena abajo de dicha secuencia que codifica un polipéptido
15 que tiene especificidad de unión o funcionalidad y separada por un sitio de entrada ribosómica interno.

En algunas realizaciones, la colección diversa de polinucleótidos codifica una pluralidad de moléculas de unión a antígeno de un vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

20 En una realización, la etapa (ii) del método comprende introducir en células hospedadoras polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican regiones VH o VL de inmunoglobulina, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, y en el que dichas secuencias de región VH y VL se codifican en vectores separados. En otra realización, la etapa (ii) del método de la invención comprende introducir en células hospedadoras polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican cadenas pesada o ligera de inmunoglobulina de longitud completa, o
25 fragmentos de unión a antígeno de las mismas, en el que dichas secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa están en vectores separados. Los vectores pueden introducirse en las células hospedadoras simultáneamente o secuencialmente. En otra realización, las secuencias que codifican regiones VH y VL o cadenas pesadas y ligeras de longitud completa se introducen en células hospedadoras en el mismo vector. En el caso de que las secuencias VH y VL o las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo de longitud completa se introduzcan en las células hospedadoras en diferentes vectores, es útil que las secuencias de repeticiones
30 terminales invertidas en cada vector se reconozcan por y sean funcionales con diferentes enzimas transposasas.

Las células hospedadoras son preferentemente células de vertebrados, y preferentemente células de mamíferos, tales como células de roedores o humanas. Son particularmente útiles células linfoides, por ejemplo, linfocitos B. Los linfocitos B pueden ser linfocitos B progenitores o linfocitos B precursores tales como, por ejemplo, linfocitos B progenitores o linfocitos B precursores transformados con virus de Leucemia Murina de Albelson y linfocitos proB y preB humanos transformados con VEB sin inmunoglobulina, tempranos. Otras células hospedadoras útiles incluyen líneas de linfocitos B tales como células Sp2/0, células NSO, células X63 y células Ag8653, o líneas celulares de mamíferos habituales tales como células CHO, células Per.C6, células BHK y células 293.

40 En una realización del método de la invención, la etapa de expresión (iii) comprende introducir en dichas células hospedadoras un vector de expresión que codifica una enzima transposasa que reconoce y es funcional con al menos una secuencia de repetición terminal invertida en los polinucleótidos. El vector que codifica la enzima transposasa puede introducirse en las células hospedadoras simultáneamente con o antes de o posteriormente a la colección diversa de polinucleótidos. En una realización, la enzima transposasa se expresa transitoriamente en dicha célula hospedadora. Como alternativa, la etapa de expresión (iii) puede comprender inducir un sistema de expresión inducible que está integrado de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, tal como, por ejemplo, un sistema inducible por tetraciclina o inducible por tamoxifeno. En una realización preferida, la etapa (iii) comprende expresar en la célula o células hospedadoras un vector que comprende una transposasa Sleeping Beauty funcional o una transposasa PiggyBac funcional. En una realización útil, la etapa (iii) comprende expresar en dicha célula hospedadora un vector que comprende SEC ID N^o: 17. En otra realización útil, el vector codifica SEC ID N^o: 18, o una secuencia con al menos 95 % de homología de secuencia de aminoácidos y que tiene la misma especificidad de secuencia de repetición terminal invertida o similar.

55 En una realización del método de la invención, la etapa de exploración (iv) comprende separación de células activadas magnética (MACS), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), selección frente a moléculas inmovilizadas en una selección de superficie sólida, selección con respecto a unión con moléculas asociadas con membrana celular incorporadas en una membrana de bicapa lipídica reconstituida de forma artificial, celular o natural, o exploración de alto rendimiento de clones celulares individuales en formato multipocillo con respecto a un fenotipo de unión o funcional deseado. En una realización, la etapa de exploración (iv) comprende explorar para identificar polipéptidos que tienen una especificidad de unión a diana o funcionalidad deseadas. En una realización preferida, la etapa de exploración (iv) comprende explorar para identificar moléculas de unión a antígeno que tengan una especificidad de unión deseada. En una realización útil, la etapa de exploración comprende además explorar para identificar moléculas de unión a antígeno que tienen una o más propiedades funcionales deseadas. La etapa de exploración (iv) puede comprender múltiples ciclos de enriquecimiento celular con expansión de células hospedadoras entre ciclos de enriquecimiento celular individuales.

En una realización del método de la invención, la etapa (v) de aislar la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad deseada comprende amplificación genómica o por RT-PCR o secuenciación profunda de siguiente generación. En una realización útil, la secuencia polinucleotídica aislada en la etapa (v) se somete a optimización de afinidad. Esto puede realizarse sometiendo la secuencia polinucleotídica aislada a PCR o RT-PCR en condiciones de mutación. En otra realización útil, la secuencia mutada se somete después a las etapas (i)-(v) del método de la invención. En una realización preferida, la secuencia polinucleotídica obtenida en (v) comprende una secuencia que codifica una región VH o VL de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y en el que dicha optimización de anticuerpo comprende introducir una o más mutaciones en una región determinante de complementariedad o región marco conservada de dicha VH o VL.

En una realización útil, las secuencias de repeticiones terminales invertidas son del sistema de transposón PiggyBac y se reconocen por y son funcionales con la transposasa PiggyBac. En una realización, la secuencia que codifica la secuencia de repetición terminal invertida PiggyBac cadena arriba comprende SEC ID N°: 1. En otra realización, la secuencia que codifica la secuencia de repetición terminal invertida PiggyBac cadena abajo comprende SEC ID N°: 2.

En otra realización útil, las secuencias de repeticiones terminales invertidas son del sistema de transposón Sleeping Beauty y se reconocen por y son funcionales con la transposasa Sleeping Beauty. En una realización, la secuencia que codifica la secuencia de repetición terminal invertida Sleeping Beauty cadena arriba comprende SEC ID N°: 14. En otra realización, la secuencia que codifica la secuencia de repetición terminal invertida Sleeping Beauty cadena abajo comprende SEC ID N°: 15.

En una realización de la invención, los polinucleótidos comprenden secuencias de la región VH o VL que codifican una secuencia derivada de un anticuerpo anti-TNF alfa humano. En una realización, el anticuerpo anti-TNF alfa humano es D2E7.

En una realización útil, la etapa (iii) comprende introducir en dicha célula hospedadora un vector que comprende una secuencia que codifica una transposasa PiggyBac funcional. En una realización el vector comprende SEC ID N°: 11. En otra realización, el vector codifica SEC ID N°: 12, o una secuencia con al menos 95 % de homología de secuencia de aminoácidos y que tiene la misma o similar especificidad de secuencia de repetición terminal invertida.

En realizaciones preferidas, las secuencias de repeticiones terminales invertidas se reconocen por y son funcionales con al menos una transposasa seleccionada del grupo que consiste en PiggyBac, Sleeping Beauty, Frog Prince, Himar1, Passport, Minos, hAT, Tol1, Tol2, Ac/Ds, PIF, Harbinger, Harbinger3-DR, y Hsmar1.

La presente invención se refiere además a una biblioteca de moléculas polinucleotídicas que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, que comprende una pluralidad de moléculas polinucleotídicas, en la que dichas moléculas polinucleotídicas comprenden una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que se reconocen por y son funcionales con al menos una enzima transposasa. Preferentemente los polinucleótidos son moléculas de ADN y comprenden una secuencia de unión a ligando de un receptor o una secuencia de unión a diana de una molécula de unión. En una realización particularmente preferida, la biblioteca comprende polinucleótidos, en los que cada polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de unión a antígeno de un anticuerpo. En una realización, la biblioteca comprende polinucleótidos que codifican una región VH o VL de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Como alternativa, los polinucleótidos pueden codificar una región VH y una región VL. En una realización preferida, los polinucleótidos de la biblioteca comprenden una secuencia que codifica una cadena pesada o ligera de anticuerpo de longitud completa (es decir, incluyendo la región constante) o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Como alternativa, los polinucleótidos pueden codificar una cadena tanto pesada como ligera de inmunoglobulina de longitud completa. En otras realizaciones, los polinucleótidos de la biblioteca comprenden una secuencia que codifica un dominio Fv monocatenario o un Fab. En realizaciones preferidas, los polinucleótidos de la biblioteca están en forma de plásmidos o amplicones de PCR de ADN bicatenario. En ciertas realizaciones, los plásmidos de la biblioteca comprenden un gen marcador. En otra realización, los plásmidos comprenden una secuencia que codifica una enzima transposasa que reconoce y es funcional con las secuencias de repeticiones terminales invertidas. En una realización, la biblioteca de la invención comprende polinucleótidos que codifican la cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa incluyendo la estructura de intrón/exón natural de una cadena pesada de anticuerpo. La cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa puede comprender el dominio de anclaje a membrana endógeno.

La presente invención también se refiere a un método para generar una biblioteca de polinucleótidos transponibles que codifican polipéptidos que tienen especificidades de unión o funcionalidad diferentes, que comprende (i) generar una colección diversa de polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, en el que dichos polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que se reconocen por y son funcionales con al menos una enzima transposasa.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende una secuencia que codifica una región VH o VL de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que se reconocen por y son funcionales con al menos una enzima transposasa. En ciertas realizaciones, el vector codifica una cadena pesada o ligera de longitud completa de una inmunoglobulina. Preferentemente, la secuencia que codifica la VH o VL o la cadena pesada o ligera es una secuencia aleatoria generada, por ejemplo, por amplificación por PCR en condiciones de mutación o síntesis génica. En una realización, el vector comprende secuencias de repeticiones terminales invertidas que se reconocen por y son funcionales con la transposasa PiggyBac. En otra realización, las secuencias de repeticiones terminales invertidas se reconocen por y son funcionales con la transposasa Sleeping Beauty. En una realización, el vector comprende una secuencia de región VH o VL derivada de un anticuerpo anti-TNF alfa tal como, por ejemplo, D2E7. En ciertas realizaciones, el vector comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 19.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende un vector de la invención como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida, la célula hospedadora comprende además un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica una transposasa que reconoce y es funcional con al menos una secuencia de repetición terminal invertida en el vector que codifica dicha secuencia de región VH o VL.

La presente invención se refiere además a moléculas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, producidos por un método que comprende la reivindicación 1.

La presente invención también se refiere a un método para generar una población de células hospedadoras capaces de expresar polipéptidos que tienen diferentes especificidades o funcionalidades, que comprende:

- (i) generar una colección diversa de polinucleótidos que comprende secuencias que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, en el que dichos polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que se reconocen por y son funcionales con al menos una enzima transposasa; y
- (ii) introducir dicha colección diversa de polinucleótidos en células hospedadoras.

Breve descripción de los dibujos/figuras

FIG. 1: a.) Este dibujo representa la configuración de un elemento transponible autónomo (TE), que puede transponerse o "saltar" en cualquier secuencia de ADN diana. Los componentes clave de un TE son una enzima transposasa activa que reconoce las repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean la enzima transposasa en sí misma cadena arriba y abajo de su secuencia. Los TE catalizan la copia o la escisión del TE, y la integración en secuencias de ADN diana no relacionadas. b.) Este dibujo representa la configuración de un sistema de vector de transposón, en el que la expresión de una enzima transposasa activa se efectúa por un vector de expresión que no está acoplado con el TE en sí mismo. En su lugar, el TE puede contener cualquier secuencia o secuencias, o gen o genes de interés que se clonan entre las ITR cadena arriba y abajo. La integración del TE que contiene cualquier secuencia o secuencias, o gen o genes de interés (por ejemplo, una biblioteca de ADN que codifica una biblioteca de proteínas) puede integrarse en secuencias de ADN diana no relacionadas, si la expresión de enzima transposasa se proporciona en *trans*, por ejemplo por una construcción de expresión de transposasa separada, como se representa en el presente documento.

FIG. 2: a) Este dibujo representa las dos maneras diferentes cómo los TE pueden "saltar" o transponerse en ADN diana no relacionado. Para transposones del grupo II la enzima transposasa en una primera etapa reconoce las ITR del elemento transponible y cataliza la escisión del TE de ADN. En una segunda etapa, el TE escindido se inserta en una secuencia de ADN diana no relacionada, que también se cataliza por la enzima transposasa. Esto da como resultado un mecanismo de transposición de "corta y pega". Para transposones del grupo I (mostrados en b.) la información codificante del TE se replica en primer lugar (por ejemplo, se transcribe y se transcribe de forma inversa, en el caso de retrotransposones) y después el TE replicado se integra en una secuencia de ADN diana no relacionada, que se cataliza por la enzima transposasa. Esto da como resultado un mecanismo de transposición de "copia y pega".

FIG. 3: Esta figura proporciona una visión de conjunto de enzimas transposasas activas que se han identificado y/o reconstruido a partir de TE inactivos, durmientes, y que se ha mostrado que pueden conferir transposición en diversas células de vertebrados y también humanas, como se proporciona en la tabla. La tabla se ha adaptado a partir de la Tabla I de la publicación Ni *et al.* Briefings Functional Genomics Proteomics 7, 444-453 (2008).

FIG. 4: Esta figura perfila al principio del método desvelado en el presente documento, para el aislamiento de información codificante para proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, con una función deseada, por ejemplo, la unión con una diana de interés, como se representa en el presente documento. El gen o los genes de interés, por ejemplo, una biblioteca de ADN transponible diversa que codifica proteínas, incluyendo cadenas polipeptídicas de anticuerpos o fragmentos de las mismas, que se clona entre repeticiones terminales invertidas (ITR) de una construcción transponible se introduce en una célula hospedadora de vertebrado junto con un vector de expresión para una enzima transposasa activa (véase parte superior del dibujo). La expresión de la enzima del transposón en dichas células hospedadoras en *trans* y la presencia del gen o los genes de

interés clonados entre ITR que pueden reconocerse por la enzima transposasa permite la integración estable del gen o los genes flanqueados por ITR de interés en el genoma de las células hospedadoras, que pueden después expresar de forma estable la proteína o las proteínas de interés codificadas por los genes de interés. La biblioteca celular que expresa la proteína o las proteínas de interés puede después explorarse con respecto a una funcionalidad deseada de las proteínas expresadas, por ejemplo, pero sin limitación, la unión de una proteína diana de interés, como se representa en el presente documento. Por medio de técnicas de separación de células conocidas en este campo, por ejemplo MACS o FACS, las células que expresan la proteína o las proteínas de interés con el fenotipo deseado y que por lo tanto contienen el genotipo correspondiente, pueden aislarse y la información codificante del gen o los genes de interés pueden recuperarse de las células aisladas por técnicas de clonación conocidas en este campo, por ejemplo pero sin limitación clonación por PCR genómica, como se representa en el presente documento.

FIG. 5a) y 5b): Este dibujo perfila la estrategia de clonación para la generación de un vector de expresión de cadena ligera kappa (LC) de inmunoglobulina (Ig) humana transponible, como se describe en el Ejemplo 1. La FIG. 5 a.) representa la estrategia de clonación para la inserción de ITR 5' y 3' del transposón *PiggyBac* en el vector de expresión de mamíferos pIRES-EGFP (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), que ya contiene el fuerte elemento promotor de células de mamífero pCMV (IE) (promotor temprano inmediato de CMV) y señales de intrón/poliA para fuerte expresión en células hospedadoras de mamífero. Además, cadena abajo del sitio de clonación múltiple que contiene ClaI, EcoRV, NotI, EcoRI, en el que pueden clonarse un gen o genes de interés, pIRES-EGFP contiene un sitio de entrada ribosómica interno (IRES) con una ORF cadena abajo de proteína verde fluorescente potenciada (EGFP), que efectúa el acoplamiento de la expresión del gen o los genes de interés clonados cadena arriba del IRES. También se representan elementos funcionales bacterianos (gen de resistencia a ampicilina, amp^R) y un origen bacteriano de replicación (Col EI) para amplificación y selección del plásmido en *E. coli*. El plásmido que contiene ITR *PiggyBac* resultante se designa pIRES-EGFP-T1T2. La FIG 5b) representa después la inserción de una LC kappa Ig humana de síntesis génica en el sitio de enzima de restricción EcoRV único de pIRES-EGFP-T1T2, que sitúa la LC kappa Ig humana cadena arriba del casete IRES-EGFP y de este modo acopla la expresión de la LC kappa Ig humana con la expresión del gen marcador EGFP. La inserción de la LC kappa Ig humana da como resultado el vector de expresión de LC kappa Ig humano transponible pIRES-EGFP-T1T2-IgL. Los dibujos muestran sitios de enzimas de restricción únicos seleccionados en los plásmidos, así como sitios duplicados seleccionados resultantes de etapas de clonación.

FIG. 6: Este dibujo perfila la clonación de un vector de expresión de cadena pesada (HC) de inmunoglobulina (Ig) gamma 1 humana transponible, que puede generarse por intercambio de la fase abierta de lectura (ORF) de LC kappa Ig humana frente a la ORF para una ORF de HC Ig gamma 1 humana. El diseño de la ORF de HC Ig gamma 1 final es similar, también con respecto a la modificación por ingeniería genética de un sitio de enzima de restricción Eco47III único que separa las regiones codificantes variable (V) de la constante (C), lo que permite el intercambio de una única región codificante V de anticuerpo frente a una biblioteca diversa de regiones codificantes de V de anticuerpo, como se describe en el Ejemplo 3.

FIG. 7: Este dibujo representa la clonación de un vector de expresión de enzima transposasa *PiggyBac* de mamífero, como se describe en el Ejemplo 4, usando pCDNA3.1(+) hygro como la cadena principal del vector de expresión de mamífero, en el que la ORF de síntesis génica de transposasa *PiggyBac* se clona en el sitio de enzima de restricción EcoRV único de pCDNA3.1(+) hygro, dando como resultado el vector de expresión de transposón *PiggyBac* pCDNA3.1(+) hygro-PB. Además en este dibujo se muestran la posición relativa de otros elementos funcionales de mamífero (promotor IE de CMV, señal poliA de BGH, segmento poliA de SV40, ORF de higromicina B) y elementos funcionales bacterianos (gen de resistencia a ampicilina, amp^R, origen de replicación, ColE1), así como sitios de reconocimiento de enzimas de restricción relevantes seleccionados.

FIG. 8: Este dibujo representa la clonación de un vector de expresión de cadena ligera kappa de inmunoglobulina (LC Kappa-Ig) humana transponible *Sleeping Beauty*, como se describe en el Ejemplo 5. La clonación puede realizarse por reemplazo secuencial de las ITR 5' y 3' de *PiggyBac* con ITR 5' y 3' de *Sleeping Beauty* en la construcción pIRES-EGFP-T1T2-IgL. Además en este dibujo se muestra la posición relativa de otros elementos funcionales de mamífero (promotor IE de CMV, señal poliA de BGH, segmento poliA de SV40, ORF de higromicina B) y elementos funcionales bacterianos (gen de resistencia a ampicilina, amp^R, origen de replicación, ColE1), así como sitios de reconocimiento de enzimas de restricción relevantes seleccionados.

FIG. 9: Este dibujo representa la clonación de un vector de expresión de enzima transposasa *Sleeping Beauty* de mamífero, como se describe en el Ejemplo 6, usando pCDNA3.1(+) hygro como la cadena principal del vector de expresión de mamífero, en el que se clona la ORF de síntesis génica de transposasa *Sleeping Beauty* en el sitio de enzima de restricción EcoRV único de pCDNA3.1(+) hygro, dando como resultado el vector de expresión de transposón *Sleeping Beauty* pCDNA3.1(+) hygro-SB. Además en este dibujo se muestra la posición relativa de otros elementos funcionales de mamífero (promotor IE de CMV, señal poliA de BGH, segmento poliA de SV40, ORF de higromicina B) y elementos funcionales bacterianos (gen de resistencia a ampicilina, amp^R, origen de replicación, ColE1), así como sitios de reconocimiento de enzimas de restricción relevantes seleccionados.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "colección diversa" significa una pluralidad de variantes o mutantes de proteínas funcionales o de unión particulares que muestran diferencias en las secuencias de nucleótidos codificantes

o en las secuencias de aminoácidos primarias, que definen funcionalidades o propiedades de unión diferentes.

Como se usa en el presente documento, "biblioteca" significa una pluralidad de polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión y/o funcionalidades. En ciertas realizaciones, la biblioteca puede comprender polinucleótidos que codifican al menos 10^2 , al menos 10^3 , al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 o al menos 10^9 polipéptidos únicos, tales como, por ejemplo, dominios VH o VL o cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo de longitud completa.

Como se usa en el presente documento, "secuencia de repetición terminal invertida" o "ITR" significa una secuencia identificada en los extremos 5' o 3' de elementos transponibles que se reconocen por transposasas y que median en la transposición de las ITR incluyendo información codificante intermedia de una construcción de ADN o locus a otra construcción de ADN o locus.

Como se usa en el presente documento, "transposasa" significa una enzima que tiene la capacidad de reconocer y de unirse con ITR y de mediar en la movilización de un elemento transponible de una secuencia de ADN diana a otra secuencia de ADN diana.

Como se usa en el presente documento, "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente con un determinante antigénico. Un ejemplo no limitante de una molécula de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento del mismo que conserva unión específica de antígeno. Por "se une específicamente" se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y puede diferenciarse de interacciones no deseadas o no específicas.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "*anticuerpo*" incluya moléculas de anticuerpo completas, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpo que tengan una región Fc y conserven especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que conservan especificidad de unión. También están abarcados fragmentos de anticuerpo que conservan la especificidad de unión incluyendo, pero sin limitación, fragmentos VH, fragmentos VL, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos (véase, por ejemplo, Hudson y Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003)).

Una realización de la invención desvelada en el presente documento es un método como se caracteriza en las reivindicaciones para la identificación de polipéptidos funcionales o de unión específicos, incluyendo, pero sin limitación cadenas de anticuerpos o fragmentos de las mismas (FIG. 4), que comprende:

i. clonación de diversas bibliotecas de ADN transponible que codifican proteínas, incluyendo cadenas polipeptídicas de anticuerpo o fragmentos de las mismas, entre repeticiones terminales invertidas (ITR) derivadas de elementos transponibles y reconocibles por y funcionales con al menos una enzima transposasa,

ii. introducción de una o más bibliotecas de ADN transponibles diversas de la etapa (i) en células hospedadoras de vertebrados por métodos convencionales conocidos en la técnica,

iii. proporcionar expresión temporal de al menos una enzima transposasa funcional en dichas células hospedadoras de vertebrados en *trans*, de modo que dichas una o más bibliotecas de ADN transponibles diversas se integran de forma estable en los genomas de células hospedadoras de vertebrados, proporcionando de este modo una población de células hospedadoras de vertebrados que después expresan de forma estable diversas bibliotecas de proteínas, incluyendo cadenas de anticuerpos o fragmentos de las mismas.

iv. exploración de dichas bibliotecas celulares diversas, que expresan de forma estable proteínas, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, con respecto a un fenotipo funcional o de unión deseado por métodos conocidos en la técnica,

v. opcionalmente, incluir ciclos de enriquecimiento por iteraciones con las células hospedadoras de vertebrados modificadas genéticamente de forma estable para un fenotipo de unión o funcional deseado, y

vi. aislamiento de los genes correspondientes de las células hospedadoras enriquecidas que codifican la unión o el fenotipo funcional deseado por métodos de clonación convencionales, conocidos en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando cebadores específicos para las secuencias contenidas en la o las construcciones de biblioteca de ADN transpuesto.

Una realización preferida de la etapa (i) es generar diversas bibliotecas de ADN transponibles bien por síntesis génica, o bien por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores apropiados para la amplificación de diversas regiones codificantes de proteínas, y moldes de ADN que comprenden diversas proteínas de unión, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, por métodos conocidos en la técnica.

Para la generación de diversas bibliotecas de anticuerpos, puede generarse una colección diversa de secuencias de cadena pesada y ligera de anticuerpos por síntesis génica convencional en la que las secuencias codificantes de región V pueden seleccionarse aleatoriamente en ciertas posiciones, por ejemplo, pero sin limitación, cualquiera o todas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones V de cadena pesada o ligera del anticuerpo. La diversidad puede restringirse a CDR individuales de las regiones V, o a posiciones de marco conservado particulares o varias, y/o a posiciones particulares en una o más de las regiones CDR. Las regiones V con variaciones diseñadas, como se ha descrito anteriormente, pueden sintetizarse como un fragmento que codifica cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo completo que se flanquean por repeticiones terminales invertidas funcionales para al menos una enzima transposasa deseada. Preferentemente, se genera la biblioteca de ADN que contiene diversos dominios variables que codifican regiones V para cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo, y flanqueada por sitios de clonación apropiados, incluyendo pero sin limitación, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, que son compatibles con sitios de clonación en vectores de expresión de cadena pesada o ligera de anticuerpo. Los sistemas de expresión de transposones útiles para su uso en los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, el sistema de transposón PiggyBac como se ha descrito, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.218.185; 6.551.825; 6.962.810; 7.105.343; y 7.932.088 y el sistema de transposón Sleeping Beauty como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 6.489.458; 7.148.203; 7.160.682; documentos US 2011 117072; US 2004 077572; y US 2006 252140.

También pueden obtenerse diversas bibliotecas de cadena pesada y ligera de anticuerpo a partir de poblaciones de linfocitos B aisladas de especies de vertebrados deseadas, preferentemente seres humanos, y preferentemente de compartimentos celulares que contienen linfocitos B, por ejemplo, pero sin limitación, sangre periférica o del cordón umbilical, y órganos linfoides como médula ósea, bazo, amígdalas y tejidos de ganglios linfáticos. En este caso, pueden aislarse diversas secuencias de región V de anticuerpo para cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo por RT-PCR o por PCR genómica usando pares de cebadores de PCR degradados específicos de cadena pesada y ligera de anticuerpo, que pueden amplificar la mayoría de familias de la región V proporcionando cebadores cadena arriba que se unen con secuencias homólogas cadena arriba de, o dentro de secuencias líder, cadena arriba de o dentro de regiones marco conservadas de región V, y proporcionando cebadores cadena abajo que se unen en regiones de homología dentro de o cadena abajo del segmento génico de unión J de regiones codificantes de dominio variable o dentro de o cadena abajo de las regiones codificantes de las regiones constantes de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo.

Los conjuntos de cebadores de PCR utilizados para la amplificación de diversas regiones codificantes variables pueden flanquearse por sitios de clonación apropiados, por ejemplo, pero sin limitación sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, que son compatibles con sitios de clonación en vectores de expresión de cadena pesada o ligera de anticuerpo.

Las bibliotecas de ADN transponibles de la etapa (i) que codifican diversas proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden proporcionarse en forma de bibliotecas de plásmidos, en las que las bibliotecas de ADN transponibles amplificadas por PCR o de síntesis génica se clonan usando sitios de clonación apropiados, como se ha mencionado anteriormente. Como alternativa, las bibliotecas de ADN transponibles que codifican diversas bibliotecas de proteínas de unión, tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos, pueden proporcionarse en forma de construcciones de ADN lineal, bicatenario, directamente como resultado de la síntesis de ADN, o como resultado de amplificación por PCR. Este último enfoque de proporcionar las bibliotecas de ADN transponible como amplicones de PCR de ADN bicatenario lineal, que no se han clonado en vectores de expresión o plásmidos (en comparación con todos los otros sistemas de expresión de células de vertebrados) tiene la ventaja de que se mantiene la máxima complejidad molecular de las bibliotecas de ADN transponibles y no se compromete por una eficacia de clonación o ligamiento limitada en un vector de expresión. Por el contrario, la clonación por ligamiento, o de otro modo, en vectores de expresión o lanzadera plasmídicos es un intermedio necesario para todos los otros sistemas de expresión de células de vertebrados basados en plásmidos o basados en vector viral.

Sin embargo, el uso de vectores de expresión de transposón basados en plásmidos que contienen las diversas bibliotecas de ADN transponible que codifican diversas proteínas de unión, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de los mismos, tiene la ventaja de que estos vectores de expresión pueden modificarse por ingeniería genética para contener elementos funcionales adicionales, lo que permite la exploración, o, como alternativa, la selección de células hospedadoras de vertebrados con transposición estable para la integración estable del vector de expresión del transposón en células hospedadoras de vertebrados con transposiciones.

Esto se consigue proporcionando en unión operativa con las diversas bibliotecas de ADN transponible, es decir, clonadas en los vectores de expresión de transposones en *cis*, casetes de expresión para genes marcadores incluyendo, pero sin limitación, proteínas marcadoras fluorescentes (proteínas verdes, amarillas, rojas o azules fluorescentes, y versiones potenciadas de las mismas, como se conoce en la técnica) o casetes de expresión para marcadores de superficie celular incluyendo, pero sin limitación, marcadores de CD, contra los que están disponibles anticuerpos de diagnóstico específicos u otras herramientas de diagnóstico.

Como alternativa, pueden proporcionarse casetes de expresión para marcadores seleccionables, que permiten la selección de células hospedadoras de vertebrados con transposiciones con respecto a resistencia a antibióticos,

incluyendo, pero sin limitación, puromicina, higromicinaB, bleomicina, resistencia a neomicina, en unión operativa con las diversas bibliotecas de ADN transponible, es decir, clonadas en los vectores de expresión de transposones en *cis*.

5 La unión operativa puede conseguirse clonando dichos casetes de expresión para genes marcadores o marcadores de resistencia a antibióticos, bien cadena arriba o bien cadena abajo de las regiones codificantes que comprenden dichas bibliotecas diversas de ADN transponible, pero dentro de las repeticiones terminales invertidas del vector de transposón.

10 Como alternativa, la unión operativa puede conseguirse clonando las regiones codificantes de dicho marcador o genes de resistencia a antibióticos cadena abajo de las regiones codificantes que comprenden dichas diversas bibliotecas de ADN transponible, pero separadas por secuencias de sitios de entrada ribosómica internos (IRES), que aseguran el acoplamiento transcripcional de la expresión de dichas diversas bibliotecas de ADN transponible con dichos genes de marcadores o de resistencia a antibióticos, y permitiendo de este modo la exploración con respecto a una selección de células hospedadoras de vertebrados con transposiciones estables.

15 En la etapa (ii) del método desvelado en el presente documento, se introducen dichas diversas bibliotecas de ADN transponible que codifican diversas bibliotecas de proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, en células hospedadoras de vertebrados deseadas por métodos conocidos en la técnica para transferir eficazmente ADN entre membranas celulares de vertebrados, incluyendo, pero sin limitación, transfección de ADN usando liposomas, fosfato cálcico, DEAE-dextrano, partículas magnéticas de polietilenimida (PEI), o mediante fusión de protoplastos, transfección mecánica, incluyendo métodos físicos o balísticos (pistola génica) o por nucleofección. Puede usarse cualquiera de los métodos anteriormente mencionados u otros métodos apropiados para transferir ADN en células hospedadoras de vertebrados individualmente, o en combinación para la etapa (ii) del método desvelado en el presente documento.

20 En el caso de proteínas diméricas, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos y fragmentos de los mismos, es una realización útil del método desvelado en el presente documento introducir diversas bibliotecas de ADN transponible y/o vectores de transposones para cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos contenidas en vectores transponibles separados, que pueden introducirse de forma independiente en las células hospedadoras de vertebrados. Esto permite la introducción secuencial de diversas bibliotecas de ADN transponible para cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo en dichas células, o su introducción simultánea de diversas bibliotecas de ADN transponible para cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo, que, en cualquiera de los casos, permite la redistribución aleatoria de cualquier cadena pesada de anticuerpo con cualquier cadena ligera de anticuerpo codificada por las al menos dos bibliotecas de ADN transponible diversas separadas.

25 Otra realización útil de la realización anterior es utilizar vectores de transposones separados y/o diversas bibliotecas transponibles de ADN para cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo, donde dichas construcciones o bibliotecas están contenidas en vectores transponibles reconocidos por diferentes enzimas transposasas (Figura 3). Esto permite la transposición independiente de construcciones de cadena pesada de anticuerpo y ligera de anticuerpo sin interferencia entre las dos enzimas transposasas diferentes, ya que un vector transponible solamente se reconoce y se transpone por su enzima transposasa específica. En el caso de la transposición secuencial de vectores transponibles o bibliotecas de ADN que codifican cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo, la ventaja de utilizar enzimas transposasas con diferentes secuencias de ITR es que, tras el segundo acontecimiento de transposición, la primera construcción ya transpuesta de forma estable no se vuelve a movilizar para transposición adicional.

30 Esta realización también permite el descubrimiento de anticuerpos por el método de selección guiada (*Guo-Qiang et al. Methods Mol. Biol. 562, 133-142 (2009)*). La selección guiada puede usarse, por ejemplo, para la conversión de cualquier anticuerpo no humano específico para una especificidad de diana/epítipo deseada y con una funcionalidad deseada en un anticuerpo completamente humano, donde se conserva la misma especificidad de diana/epítipo y funcionalidad. El principio de selección guiada implica la expresión de una única cadena de anticuerpo (cadena pesada o ligera) de un anticuerpo de referencia (el "guía"), en combinación con una biblioteca diversa de las cadenas de anticuerpos complementarios (es decir cadena ligera, o pesada, respectivamente), y la exploración de estas combinaciones de cadena pesada-ligera con respecto al fenotipo funcional o de unión deseado. De esta manera, la primera cadena de anticuerpo "guía" la selección de una o más cadenas de anticuerpo complementarias de la biblioteca diversa con respecto al fenotipo funcional o de unión deseado. Una vez que se aíslan la o las cadenas de anticuerpo complementarias nuevas, estas pueden clonarse en vectores de expresión y usarse de nuevo para "guiar" la selección de la segunda cadena de anticuerpo complementaria de una biblioteca de cadenas de anticuerpo diversa. El resultado final de este proceso de dos etapas es que las cadenas tanto pesadas como ligeras del anticuerpo original de un anticuerpo de referencia se reemplazan por secuencias de cadena de anticuerpo nuevo y no relacionado de las bibliotecas diversas, pero cuando la combinación de cadena pesada-ligera del anticuerpo nuevo muestra las mismas propiedades funcionales o de unión, o similares, del anticuerpo de referencia original. Por lo tanto, este método requiere la capacidad de expresar independientemente construcciones de cadena pesada y ligera de anticuerpo o bibliotecas en las células hospedadoras de vertebrados, que pueden conseguirse por la realización preferida para proporcionar casetes de expresión de cadena pesada y ligera de anticuerpo en diferentes sistemas de vector transponible, reconocidos por diferentes enzimas de transposones.

Sin embargo, también pueden construirse bibliotecas de ADN transponible diversas de manera que las regiones codificantes de proteínas multiméricas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, estén contenidas en el mismo vector de transposición, es decir cuando la expresión de las al menos dos subunidades diferentes de una proteína multimérica, por ejemplo regiones VH y VL o cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, está unida operativamente por clonación de los casetes de expresión respectivos o regiones codificantes en el mismo vector transponible.

Son células hospedadoras de vertebrados útiles para la introducción de construcciones transponibles y/o bibliotecas de ADN transponible de la etapa (ii) las células de especies de vertebrados que pueden inmortalizarse o que están inmortalizadas y que pueden cultivarse en medios de cultivo celular apropiados y en condiciones conocidas en la técnica. Estas incluyen, pero sin limitación, células de, por ejemplo, ranas, peces, aves, pero preferentemente de especies de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, células de roedores, rumiantes, especies de primates no humanas y seres humanos, prefiriéndose las células de origen roedor o humano.

Los tipos celulares útiles de las especies anteriormente mencionadas incluyen, pero sin limitación las células del linaje linfocítico, que pueden cultivarse en suspensión y a altas densidades, prefiriéndose las células derivadas del linaje B, ya que expresan de forma endógena todas las proteínas, factores, chaperonas y enzimas post-traduccionales requeridas para la expresión óptima de muchas proteínas, en particular de anticuerpos, o proteínas basadas en anticuerpo. De las células de vertebrados derivadas de linaje B, se prefieren las que representan estadios de diferenciación tempranos, y se conocen como linfocitos de progenitores (pro) o precursores (pre), ya que dichos linfocitos pro- o preB en la mayoría de los casos no expresan cadenas de anticuerpos endógenas que podrían interferir con la expresión de cadena de anticuerpo exógena o heteróloga que son parte del método desvelado en el presente documento.

Son células de linaje pro- y pre-B útiles de origen roedor los linfocitos proB y preB transformados por virus de leucemia murina de Abelson (A-MuLV) (*Alt et al. Cell 27, 381-390 (1981)*) que expresan todos los componentes necesarios para la expresión de anticuerpos y también para su deposición en superficie apropiada, incluyendo los componentes receptores de linfocitos B Ig-alfa (CD79a, o mb-1), e Ig-beta (CD79b, o B-29) (*Hombach et al. Nature 343, 760-762 (1990)*), pero como se ha mencionado anteriormente, carecen en su mayoría de la expresión de cadenas de anticuerpo o inmunoglobulina endógenas. Aquí, se prefieren linfocitos pro- y preB transformados por A-MuLV que derivan de mutantes de ratón, incluyendo, pero sin limitación, mutantes de ratón defectuosos en el gen activador de recombinación 1 (RAG-1) o gen activador de recombinación 2 (RAG-2), o animales que portan otras mutaciones en genes requeridos para recombinación de V(D)J, por ejemplo, XRCC4, ADN ligasa IV, Ku70 o Ku80, Artemis, proteína quinasa dependiente de ADN, subunidad catalítica (ADN-PK_{cs}), y por lo tanto carecen de la capacidad para expresar normalmente polipéptidos de anticuerpos endógenos.

Son tipos útiles adicionales de células de linaje B progenitoras (pro) y precursoras (pre), linfocitos proB y preB humanos transformados por VEB sin inmunoglobulina (sin Ig) (*Kubagawa et al., PNAS 85, 875-879 (1988)*) que también expresan todos los factores requeridos para expresión, modificación post-traduccionales y expresiones de superficie de anticuerpos exógenos (incluyendo CD79a y CD79b).

Pueden usarse otras células hospedadoras del linaje B, que representan estadios de diferenciación de células plasmáticas del linaje de linfocitos B, preferentemente, pero sin limitación, líneas celulares de mieloma sin Ig, como Sp2/0, NSO, X63, Ag8653, y otras células de mieloma y plasmocitoma, conocidas en la técnica. Opcionalmente, estas líneas celulares pueden transfectarse de forma estable o modificarse genéticamente de forma estable por otros medios distintos de transfección, para sobreexpresar componentes del receptor de linfocitos B Ig-alfa (CD79a o mb-1), e Ig-beta (CD79b o B-29), en caso de que se desee deposición en superficie óptima de anticuerpos expresados de forma exógena.

Pueden usarse otras líneas celulares de mamífero no linfocíticas, incluyendo pero sin limitación, células hospedadoras de expresión de anticuerpos convencionales en la industria, incluyendo, pero sin limitación, células CHO, células Per.C6, células BHK y células 293 como células hospedadoras para el método desvelado en el presente documento, y cada una de estas células puede además opcionalmente transfectarse de forma estable o modificarse genéticamente de forma estable para sobreexpresar componentes del receptor de linfocitos B Ig-alfa (CD79a o mb-1) e Ig-beta (CD79b o B-29), en caso de que se desee deposición de superficie óptima de anticuerpos expresados de forma exógena.

Esencialmente, puede usarse cualquier célula hospedadora de vertebrado, que sea transfectable, para el método desvelado en el presente documento, lo que representa una ventaja importante en comparación con cualquier sistema de expresión viral, tal como, pero sin limitación, sistemas de expresión de virus vaccinia, retroviral, adenoviral o de virus sindbis, debido a que el método desvelado en el presente documento no muestra restricción de células hospedadoras debido al tropismo del virus para ciertas especies o tipos celulares, y además puede usarse con todas las células de vertebrados, incluyendo células humanas, al nivel de bioseguridad más bajo, aumentando su utilidad general.

La etapa (iii) del método desvelada en el presente documento da como resultado la modificación genética estable de células hospedadoras de vertebrados deseadas con las construcciones transponibles transfectadas de la etapa (ii) por expresión temporal, o transitoria, de una enzima transposasa funcional, de modo se genere que una población estable de células hospedadoras de vertebrados que exprese bibliotecas diversas de proteínas codificadas por dichas construcciones.

Una realización útil de la etapa (iii) es introducir transitoriamente en las células hospedadoras, preferentemente por co-transfección, como se ha descrito anteriormente, un vector de expresión de vertebrados que codifique una enzima transposasa funcional junto con dicha al menos una biblioteca de ADN transponible diversa. Debe entenderse que la co-transfección o co-integración transitoria de un vector de expresión de transposasa puede realizarse simultáneamente, o poco antes o después de la transferencia de las construcciones transponibles y/o bibliotecas de ADN transponible diversas en las células hospedadoras de vertebrados, de modo que la transposasa expresada de forma transitoria puede usar óptimamente los vectores transponibles introducidos de forma transitoria de la etapa (ii) para la integración de la biblioteca de ADN transponible en el genoma de la célula hospedadora de vertebrado.

Otra realización útil de la etapa (iii) es efectuar la integración estable de los vectores transponibles introducidos y/o bibliotecas de ADN transponible de la etapa (ii) expresando de forma transitoria una enzima transposasa funcional por medio de un sistema de expresión inducible conocido en la técnica, que ya está integrado en el genoma de la célula hospedadora de vertebrado. Dicha expresión inducible y transitoria de una transposasa funcional puede conseguirse, por ejemplo, mediante sistemas promotores inducibles por tetraciclina (tet-on/tet-off) o inducible por tamoxifeno conocidos en la técnica. En este caso, solo es necesario introducir el o los vectores transponibles o bibliotecas de ADN en el genoma de la célula hospedadora, y la transposición estable de las construcciones y la expresión estable de las proteínas codificadas por el o los vectores transponibles o bibliotecas de ADN se efectúa por la expresión activada de forma transitoria de la enzima transposasa funcional en las células hospedadoras.

La etapa (iv) del método desvelado en el presente documento efectúa el aislamiento de células hospedadoras de vertebrados con transposición que expresan proteínas con un fenotipo de funcionalidad o unión deseado.

Una realización preferida de la etapa (iv) es explorar con respecto a y aislar las células hospedadoras con transposición de la etapa (iii) que expresan proteínas deseadas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, con ensayos de unión a diana y por medio de técnicas de separación de células convencionales, como separación de células activadas magnética (MACS) o separación de células activadas por fluorescencia de alta velocidad (FACS) conocidas en este campo. Especialmente, en una primera etapa de enriquecimiento de una población específica de células hospedadoras de vertebrados con transposición, en la que es necesario procesar un gran número de células, se prefiere aislar células específicas diana de un gran número de células no específicas por técnicas basadas en MACS.

Particularmente, para ciclos de enriquecimiento de células adicionales y por iteraciones, se prefiere enriquecimiento de FACS, ya que es necesario procesar potencialmente menores números de células, y debido a que la citometría de flujo multicanal permite el enriquecimiento simultáneo de funcionalidades, incluyendo, pero sin limitación, unión con una diana específica de más de una especie, o la exploración específica con respecto a epítomos particulares usando anticuerpos de competición específicos de epítomo en la exploración de FACS.

Si van a descubrirse proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que interaccionen con compañeros de unión solubles, estos compañeros de unión se marcan preferentemente con marcadores o etiquetas específicos, tales como pero sin limitación biotina, myc o marcadores de HA conocidos en la técnica, que pueden detectarse por reactivos secundarios, por ejemplo pero sin limitación, estreptavidina o anticuerpos, que en sí mismos están marcados de forma magnética (para enriquecimiento celular basado en MACS) o con fluorocromos (para enriquecimiento celular basado en FACS), de modo que pueden aplicarse las técnicas de separación de células.

Si van a descubrirse proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, contra proteínas unidas a membrana, que no pueden expresarse fácilmente como proteínas solubles, como por ejemplo, pero sin limitación, tetraspaninas, proteínas de 7 dominios transmembrana (como receptores acoplados a proteína G) o canales iónicos, estas pueden expresarse en partículas virales, o sobreexpresarse en líneas celulares específicas, que después se usan para métodos de marcaje o selección conocidos en la técnica, que pueden enriquecer las células hospedadoras de vertebrados que expresan las proteínas de las construcciones transpuestas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos.

Debido al acoplamiento genotipo-fenotipo estable en la población de células hospedadoras de vertebrados con transposición estable, una realización útil de la etapa (v) es repetir los ciclos de enriquecimiento celular para un fenotipo funcional o de unión deseado, hasta que se obtiene una población de células definida que se asocia con un fenotipo funcional o de unión deseado. Opcionalmente, pueden aislarse clones de células individuales por ejemplo, pero sin limitación, separación de células individuales usando tecnología de citometría de flujo, o por dilución limitante, para recuperar la información de ADN transpuesto de clones de células individuales que se acoplan a un fenotipo funcional o de unión deseado, particular.

Para la identificación de anticuerpos específicos de diana funcionales es con frecuencia favorable no solamente explorar y seleccionar con respecto a un fenotipo de unión particular, sino explorar adicionalmente con respecto a propiedades funcionales adicionales de anticuerpos específicos de diana, en particular efectos antagonistas o agonistas en un ensayo biológico.

5 Por lo tanto, es deseable poder "cambiar" eficazmente la expresión de anticuerpo unido a membrana por expresión de anticuerpo secretado en las células hospedadoras de vertebrados con suficiente rendimiento para producir una cantidad suficiente de un clon de anticuerpo particular para ensayos funcionales.

10 En células de linaje B natural el cambio de expresión de anticuerpo unido a membrana a secretado se produce mediante un mecanismo de corte y empalme alternativo, en el que en los linfocitos preB y B un donante de corte y empalme alternativo cerca del extremo 3' del último exón de región constante de cadena pesada se corta y se empalma preferentemente en un aceptor de corte y empalme de un exón de anclaje de membrana cadena abajo de los exones de región constante de cadena pesada. De esta manera, se produce una cadena pesada de anticuerpo
15 en linfocitos B con un dominio transmembrana, extendido, C-terminal, que ancla la cadena pesada y por lo tanto el anticuerpo que contiene cadena pesada-ligera completo en la membrana celular. El dominio de transmembrana, C-terminal, también interacciona de forma no covalente con los componentes transmembrana Ig-alfa (CD79a o mb-1) e Ig-beta (CD79b o B29), lo que probablemente da como resultado mejor anclaje de membrana y mayor expresión de inmunoglobulina en superficie en células de linaje B.

20 Una vez que un linfocito B se diferencia adicionalmente al estadio de célula plasmática, ya no se produce el corte y empalme alternativo y el donante de corte y empalme alternativo cerca del extremo 3' de la última región constante de cadena pesada ya no se reconoce ni se utiliza, y el molde de ARNm se termina cadena abajo del codón de parada de región constante de cadena pesada, y se traduce una cadena pesada de un anticuerpo secretado.

25 Para aprovechar este mecanismo natural de corte y empalme alternativo y "cambio" de expresión unida a membrana a secretada de anticuerpos expresados, es una realización útil del método desvelado en el presente documento construir los vectores transponibles y diversas bibliotecas de ADN que codifican proteínas, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, de tal manera que se mantiene la estructura de intrón/exón natural de una cadena pesada de anticuerpo constante, incluyendo los exones que codifican los dominios transmembrana. Esta realización
30 representa una clara ventaja frente a sistemas de expresión retrovirales, ya que el genoma del vector retroviral ya está cortado y empalmado antes de empaquetarse en una partícula retroviral y transducirse de forma estable en el genoma de la célula hospedadora.

35 Otros sistemas de vector viral pueden restringirse en la longitud del inserto de ADN que puede incorporarse a los vectores, evitando de esta manera la clonación de regiones genómicas mayores en dichos vectores de expresión y evitando de este modo el aprovechamiento del "cambio" natural de expresión de anticuerpo unido a membrana a secretado por corte y empalme alternativo. Ciertos transposones (por ejemplo, *Tol2*, véase Figura 3), se han caracterizado como capaces de transponer eficazmente fragmentos de ADN de más de 10 kb en células
40 hospedadoras de vertebrados sin ninguna pérdida de eficacia de transposición (*Kawakami Genome Biol. 8, Supl I, S7 (2007)*). Por lo tanto, es una realización útil del método desvelado en el presente documento construir vectores de expresión transponibles que comprenden estructuras exónicas/intrónicas genómicas para una expresión mejor y apropiada y para el cambio de regulación natural de expresión de anticuerpo unido a membrana a secretado. Los métodos de la invención son útiles para transponer fragmentos de ADN de al menos 5 kb, al menos 6 kb, al menos 7 kb, al menos 8 kb, al menos 9 kb, al menos 10 kb de tamaño en genomas de células hospedadoras.

La diferenciación del estadio de diferenciación de linaje B anterior que favorece la expresión de anticuerpo unido a membrana, a un estadio de célula plasmática, posterior, que favorece la expresión de anticuerpo secretado puede inducirse por factores de diferenciación de linfocitos B, tales como, pero sin limitación, desencadenamiento de CD40/IL4, o estimulación por mitógenos, tales como, sin limitación, lipopolisacáridos (LPS) u otros activadores policlonales, activadores de cepa Cowan de *Staph. aureus* (SAC), y nucleótidos CpG, o cualquier combinación de los mismos.

55 Preferentemente, esta diferenciación se efectúa en células transformadas, en las que la proliferación puede inhibirse artificialmente, de modo que puede producirse de nuevo diferenciación de linfocitos B apropiada, como ya se ha descrito para linfocitos preB murinos transformados por A-MuLV, en los que la tirosina quinasa de Abelson se inhibe específicamente por el inhibidor de tirosina Gleevec (*Muljo et al. Nat. Immunol 4, 31-37 (2003)*). Por lo tanto, es una realización preferida utilizar linfocitos preB murinos transformados por A-MuLV sin Ig para el método, que por
60 tratamiento con Gleevec, pueden de nuevo diferenciarse en estadios de linfocitos B más maduros, incluyendo células plasmáticas, que después secretan suficientes cantidades de anticuerpo secretado para ensayos funcionales adicionales basándose en el corte y empalme alternativo de construcciones de expresión de cadena pesada genómica. Es una realización preferida del método desvelado en el presente documento, mejorar adicionalmente dicha diferenciación de células de linaje B por sobreexpresión estable de factores anti-apoptóticos, conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, bcl-2 o bcl-x_L.

65

Después de la etapa (iv), se ha realizado el enriquecimiento de células hospedadoras de vertebrados con transposición como se ha descrito anteriormente, opcionalmente, pueden realizarse enriquecimientos celulares adicionales de acuerdo con los métodos anteriormente mencionados (etapa (v)), hasta que se aislen poblaciones celulares, o células individuales que expresen proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, con propiedades funcionales y/o de unión deseadas.

La etapa (vi) del método desvelado en el presente documento se realiza después para aislar la información codificante relevante contenida en las células hospedadoras de vertebrados transpuestas, aisladas con respecto a una propiedad funcional y/o de unión deseada.

Una realización útil de la etapa (vi) para el aislamiento, clonación y secuenciación de la información codificante relevante con respecto a una proteína funcional o de unión deseada, incluyendo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, contenida en las células aisladas, es utilizar amplificación genómica o por RT-PCR con pares de cebadores específicos para la información codificante relevante comprendida en las construcciones de ADN transpuesto, y para secuenciar los amplicones genómicos o de RT-PCR bien directamente, o bien después de sub-clonar en vectores de secuenciación, conocidos en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, vectores de clonación TA o Gateway.

Otra realización útil de la etapa (vi) es someter las poblaciones de células enriquecidas de las etapas (iv) o (v), que muestran un fenotipo funcional o de unión deseado a secuenciación de siguiente generación ("profunda") (*Reddy et al. Nat. Biotech. 28, 965-969 (2010)*), para recuperar directamente y en una etapa un conjunto representativo de varios miles de secuencias para la información codificante contenida en las construcciones de ADN transpuesto. Basándose en un análisis bioinformático de la frecuencia relativa de secuencias identificadas de las poblaciones celulares enriquecidas, permite una predicción acerca de qué secuencias codifican una proteína funcional o de unión, incluyendo un anticuerpo o fragmento del mismo (*Reddy et al. Nat. Biotech. 28, 965-969 (2010)*). Las secuencias sobrerrepresentadas estadísticamente se vuelven a sintetizar después y se clonan en un vector de expresión para expresión como proteínas recombinantes, anticuerpos o fragmentos de los mismos, para caracterizarlas funcionalmente y con respecto a sus propiedades de unión. Este método puede acelerar significativamente la identificación de secuencias relevantes dentro de una población celular enriquecida funcional y fenotípicamente, que expresa proteínas con propiedades específicas funcionales o diana.

Otra realización útil más del método desvelado en el presente documento es utilizar expresión celular de proteínas de vertebrados mediada por transposición, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, para la mutagénesis y optimización de proteínas deseadas, incluyendo la optimización de afinidad de anticuerpos y fragmentos de los mismos.

Esto puede conseguirse aislando los genes que codifican las proteínas, incluyendo cadenas de anticuerpo o fragmentos de las mismas, de poblaciones celulares de vertebrados con transposiciones enriquecidas con respecto a un fenotipo de unión o funcional deseado de acuerdo con los métodos desvelados en la etapa (iv), tal como, pero sin limitación, por amplificación por PCR genómica o RT-PCR en condiciones mutantes, conocidas en la técnica. Las secuencias mutadas pueden volver a clonarse después en vectores de transposición y después volver a transponerse en células hospedadoras de vertebrados, para someterlos a exploración de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, con respecto a propiedades funcionales o de unión mejoradas.

En una realización útil de este enfoque, se usan cebadores específicos que permiten la amplificación por PCR en condiciones mutantes de construcciones transpuestas completas, incluyendo las ITR flanqueantes.

Por este método se genera un amplicón de PCR mutado que contiene una frecuencia media definida de mutaciones aleatorias de las células con transposición seleccionadas funcional o fenotípicamente. Dicho amplicón de PCR con mutaciones (variaciones) controladas de los moldes originales pueden ahora volver a transponerse directamente en nuevas células hospedadoras de vertebrados, de acuerdo con realizaciones preferidas desveladas en los métodos aplicables en la etapa (ii).

La principal ventaja de este método sobre otros enfoques de células de vertebrados modificadas genéticamente es que con esta tecnología no se requiere nueva clonación que consume tiempo de los amplicones de PCR mutados y control de calidad que consume tiempo de las secuencias mutadas en vectores de expresión, que es un requisito obligatorio en todos los demás sistemas de expresión virales o basados en plásmidos, si va a someterse a una secuencia mutada a otro ciclo de exploración.

Debido a que la transposición de ADN solamente requiere la presencia de ITR que flanquean la región codificante de genes de interés, los amplicones de PCR mutados amplificados por PCR pueden volver a introducirse directamente y volver a transponerse en células hospedadoras de vertebrados nuevas para expresión y exploración con respecto a propiedades mejoradas y/o mutantes de afinidad madurada.

Sumados juntos, los métodos desvelados en el presente documento, para utilizar los TE para la modificación genética estable de células hospedadoras de vertebrados con construcciones transponibles y/o bibliotecas de ADN

transponible diversas que codifican proteínas, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, ofrece una eficacia, flexibilidad, utilidad y velocidad sin precedentes para el descubrimiento y optimización de dichas proteínas para fenotipos funcionales o de unión deseados óptimos.

5 **Ejemplos:**

Ejemplo 1: Clonación del vector de expresión de cadena ligera transponible para cadenas ligeras kappa de anticuerpo humano compatibles con la enzima transposasa PiggyBac.

10 Puede generarse un vector de expresión transponible para cadenas ligeras kappa humanas clonando las ITR del sistema de transposón *PiggyBac* cadena arriba y cadena abajo de un casete de expresión de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana.

15 Para esto, como una primera etapa, las secuencias mínimas para las ITR cadena abajo y cadena arriba del transposón *PiggyBac* pueden derivar de pXLBacII (publicado en el documento US 7.105.343 y pueden sintetizarse de forma génica los sitios de enzimas de restricción flanqueantes para clonación en el vector de expresión de mamíferos pIRES-EGFP (PT3157-5, número de orden 6064-1, *Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos*.)

20 La secuencia de ITR de *PiggyBac* cadena arriba con la repetición 5' terminal tiene que sintetizarse de forma génica con secuencia de enzimas de restricción MunI flanqueante (en negrita y subrayada), compatible con un sitio de enzima de restricción MunI único en pIRES-EGFP, y cuatro nucleótidos aleatorios adicionales (en minúscula) que permiten la digestión por enzimas apropiada. Esta secuencia es la siguiente:

25 Sec-ID1:
5' -
atat**CAATTG**TAAACCCTAGAAAGATAGTCTGCGTAAAAATTGACGCATGCATTCTTGAAATATTGCTCTCTC
TTTCTAAATAGCGCGAATCCGTCGCTGTGCATTTAGGACATCTCAGTCGCCGCTTGGAGCTCCCGTGAGGCC
TGCTTGTCAAATGCGGTAAGTGTCACTGATTTTGAACTATAACGACCGCGTGAGTCAAAATGACGCATGATTA
TCTTTTACGTGACTTTTAAAGATTTAACTCATACGATAATTATATTGTTATTTTCATGTTCTACTTACGTGATA
ACTTATATATATATATATTTTCTTGTATATAC**CAATTG**atat - 3'

30 Los sitios de enzimas de restricción MunI en cada extremo están subrayados y en negrita, las adiciones de nucleótidos aleatorios en los extremos están en minúscula.

35 La secuencia de ITR *PiggyBac* cadena abajo con la repetición 3' terminal tiene que sintetizarse de forma génica con una secuencia de enzima de restricción XhoI flanqueante (en negrita y subrayada) compatible con un sitio de enzima de restricción XhoI único en pIRES-EGFP, y cuatro nucleótidos aleatorios adicionales (en minúscula) permitiendo la digestión con enzimas de restricción apropiada. Esta secuencia es la siguiente:

Sec-1D2:
5'-
atat**CTCGAG**TAAACCCTAGAAAGATAATCATATTGTGACGTACGTTAAAGATAATCATGCGTAAAAATTGAC
GCATGTGTTTTATCGGTCTGTATATCGAGGTTTTATTTATTAATTTGAATAGATATTAAGTTTTATTTATTTT
ACACTTACATACTAATAATAAATCAACAAACAATTTATTTATGTTTATTTATTTATTTAAACAAAAACAAAA
ACTCAAAATTTCTTCTATAAAGTAACAAACTTTTATC**CTCGAG**atat - 3'

40 Tras la digestión con enzimas de restricción MunI de la Sec-IDI de síntesis génica, el fragmento de ADN puede ligarse en pIRES-EGFP linealizado con MunI, generando pIRES-EGFP-TR1 de acuerdo con métodos convencionales, conocidos en la técnica. La orientación apropiada del inserto puede verificarse por digestión con enzima de restricción de diagnóstico y/o mediante secuenciación de ADN de la construcción clonada (Figura 5a).

45 En una siguiente etapa el fragmento de ADN digerido con XhoI y de síntesis génica Sec-ID2, puede ligarse en pIRES-EGFP-T1 linealizado por XhoI (Figura 5a) por métodos convencionales conocidos en la técnica para generar pIRES-EGFP-T1T2, que contiene ITR *PiggyBac* tanto cadena arriba como cadena abajo del casete de expresión IRES-EGFP (Figura 5b). La orientación apropiada del inserto puede verificarse por digestión con enzimas de restricción de diagnóstico, y/o mediante secuenciación de ADN de la construcción clonada (Figura 5b).

50

Para la clonación de una cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana en el vector pIRES-EGFP-T1T2, puede sintetizarse la cadena ligera kappa Ig humana del anticuerpo específico anti-TNF-alfa humano D2E7, que puede recuperarse de la solicitud de Patente Europea EP 1 285 930.

- 5 La región V de D2E7 fusionada en fase con una secuencia líder Vk1-27 (entrada de GenBank: X63398.1), que es el miembro de la familia de V-kappa del gen de línea germinal más cercano de D2E7, y con la región constante kappa humana (entrada de Genbank: J00241) tienen la siguiente secuencia de nucleótidos:

Sec-ID3:

10

5'-atggacatgagggtccctgctcagctcctgggactcctgctgctctggctcccaggtgccagatgtGACATCCA
 GATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTACCATCACTTGTCTGGGCAAGTCAGGGC
 ATCAGAAATTACTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTT
 TGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACA
 GCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTG
 GAAATCAAGCGCTCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG
 CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA
 ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACC
 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAA-3'

Esta se traduce en la siguiente secuencia de aminoácidos:

15

Sec-ID4

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
 ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

El fragmento de ADN Sec-ID3 que codifica la cadena ligera kappa de Ig D2E7 de Sec-ID4 puede sintetizarse de forma génica y ligarse directamente por ligamiento de extremos romos en el sitio de enzima de restricción EcoRV único (que también corta en extremos romos), por métodos conocidos en la técnica, dando como resultado la construcción pIRES-EGFP-T1T2-IgL (Figura 5b).

25

Sec-ID3 se ha obtenido por ingeniería genética para contener un sitio de enzima de restricción Eco47III único entre las regiones codificantes de V-kappa y C-kappa (destacadas en negrita y subrayadas), lo que permite el reemplazo de regiones V-kappa en esta construcción frente a otras regiones V-kappa o bibliotecas de V-kappa, usando una enzima de restricción única cadena arriba de la región codificante de V-kappa en la construcción, junto con Eco47III. La orientación apropiada del inserto de cadena ligera kappa puede verificarse por digestión con enzimas de restricción de diagnóstico, y/o mediante secuenciación de ADN de la construcción clonada (Figura 5b).

30

La secuencia para el vector de cadena ligera kappa de anticuerpo humano transponible pIRES-EGFP-T1T2-IgL se proporciona en la secuencia Sec-ID5:

Sec-ID5:

35

5'-
 GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA

GCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAA
GGCAAGGCTTGACCGACAATTGTTAACCTAGAAAGATAGTCTGCGTAAAATTGACGCATGCATTCTTGAAA
TATTGCTCTCTCTTTCTAAATAGCGCGAATCCGTCGCTGTGCATTTAGGACATCTCAGTCGCCGCTTGGAGC
TCCCGTGAGGCGTGCTTGTCAATGCGGTAAGTGTCACTGATTTTGAACATAACGACCGCGTGAGTCAAAAT
GACGCATGATTATCTTTTACGTGACTTTTAAAGATTTAACTCATAACGATAATTATATTGTTATTTTCATGTTCT
ACTTACGTGATAACTTATTATATATATATTTTCTTGTATACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGG
CGTTTTGCGTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATGATTATTGACTAGTTATTAATAG
TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC
CCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA
ATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTAC
ATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGAC
GTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTG
ACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCC
ACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATC
GATatggacatgaggggtccctgctcagctcctgggactcctgctgctgctgctcccaggtgccagatgtGAC
ATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTCACCATCACTTGTCCGGCA
AGTCAGGGCATCAGAAATTACTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTAT
GCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGTCCCATCTCGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATACT
TTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAATCAAGCGCTCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCCTGTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
TGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAATCTGC
GGCCGCGTCGACGGAATTCAGTGGATCCACTAGTAACGGCCGCGAGTGTGCTGGAATTAATTCGCTGTCTGC
GAGGGCCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTC
CAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTC
AGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGAC
AATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTGCAGGTGAGCATGCATCT
AGGGCGGCCAATTCGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCC
GGTGTGCGTTTGTCTATATGTGATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTG
GCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTTAGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATG
TCGTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCTTTGCAGGCAGC
GGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACTGCAAAGCGCG
CACAAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCA
ACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCT
TTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAA
AAACACGATGATAAGCTTGCACAACCCGGGATCCACCGGTGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG

TTCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC
 GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTG
 CCCTGGCCCACCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGTACCCCCGACCACATGAAG
 CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAC
 GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
 ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTAT
 ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
 GTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAC
 TACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTC
 GTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCCTAGAGCTCGTGTATCA
 GCCTCGACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCTGGAAG
 GTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAAATGAGGAAATTCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCAATCTA
 TTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGTGGGGATG
 CGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCGAGGATAAAAAGTTTTGTTACTTTATA
 GAAGAAATTTGAGTTTTTGTTTTTTTTTAATAAAATAAATAAACATAAAATAAATGTTTTGTTGAATTTATTA
 TTAGTATGTAAGTGTAATATAATAAACTTAATATCTATTCAAATTAATAAATAAACCTCGATATACAGAC
 CGATAAAACACATGCGTCAATTTTACGCATGATTATCTTTAACGTACGTACAATATGATTATCTTTCTAGG
 GTTAACTCGAGTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTC
 GACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT
 TCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT
 AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA
 ACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT
 CGTTCGGCTCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA
 CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGC TGCGT
 TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
 AGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCT
 TACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCT
 CAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGC
 CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
 TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTA
 CACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC
 TTGATCCGGCAAACAACACCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
 AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTA
 AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAA
 ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC
 AGCGATCTGTCTATTTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
 CTTACCATCTGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT
 AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTA
 TTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG
 CATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTAC

ATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC
 CGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT
 TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
 GGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
 GGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTG
 ATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAA
 GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCA
 GGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCAC
 ATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC - 3'

Ejemplo 2: Clonación de un vector de expresión de cadena pesada transponible para cadenas pesadas de anticuerpo gamma1 humano:

5 Para clonar un vector de cadena pesada transponible, simplemente es necesario cambiar la ORF de pIRES-EGFP-T1T2-IgL con una región codificante de cadena pesada de IgG1 completamente humana.

10 Para el reemplazo de la cadena ligera kappa humana en el vector pIRES-EGFP-T1T2-IgL por una cadena pesada de inmunoglobulina gamma-1 humana, la región VH del anticuerpo D2E7, que es específica para TNF-alfa humano (véase: documento EP 1 285 930 A2) puede sintetizarse y fusionarse en fase con la secuencia líder de un miembro de la familia de región VH3 de línea germinal cercano y además fusionarse en fase con la región codificante de una región constante gamma1 humana (*GenBank: J00228*) que incluye los exones transmembrana (*GenBank: X52847*).
 15 Para poder reemplazar la cadena ligera kappa Ig humana de pIRES-EGFP-T1T2 IgL es necesario que haya sitios de enzimas de restricción ClaI y NotI únicos en los extremos 5' y 3' de la secuencia (subrayado), respectivamente, incluyendo cuatro nucleótidos que flanquean los sitios de enzimas de restricción (destacados en minúscula en los extremos de la secuencia), permitiendo la digestión con enzimas de restricción apropiada del fragmento de ADN de síntesis génica y ligamiento en la cadena principal de pIRES-EGFP-T1T2 IgL linealizado por ClaI-NotI, de acuerdo con métodos convencionales. La secuencia que es necesario sintetizar por genes es la siguiente secuencia:
 20 Sec-ID6:

Sec-ID6:

5'-
 aat tATCGATATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCGATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGT
 GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCCGGCAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCGGCCTCTGG

ATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGC
TATCACTTGGAAATAGTGGTCACATAGACTATGCGGACTCTGTGGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGATACGGCCGTATATTACTGTGCGAA
AGTCTCGTACCTTAGCACCGCGTCTCCCTTGACTATTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCG**AGCGC**
TTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCAGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGCA
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT
GACCAAGAACCAGGTGACCGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC'TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT
CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGAGCTGCAACTGGAGGAGAGCTGTGC
GGAGGGCAGGACGGGGAGCTGGACGGGTGTGGACGACCATCACCATCTTCATCACACTCTTCTGTTAAG
CGTGTGCTACAGTGCCACCGTACCTTCTTCAAGGTGAAGTGGATCTTCTCCTCGGTGGTGGACCTGAAGCA
GACCATCATCCCCGACTACAGGAACATGATCGGACAGGGGGCCTAGGCGGCCGgtcg - 3'

5 Desde el codón de inicio en la posición 11 de Sec-ID6, esta secuencia de nucleótidos se traduce en la cadena pesada de IgG1 humana del clon específico anti-TNF-alfa D2E7 (véase: documento EP 1 285 930 A2), pero incluyendo los exones transmembrana gamma1 humanos M1 y M2. La traducción de la proteína se proporciona en SEC-ID7 a continuación.

Sec-ID7:

MEFGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSAITW
NSGHIDYADSV EGRFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVVYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPQL EESCAEAQDGE L DGLWTTITITIFITLFLLSVCY
10 SATVTFKVKWIFSSVVDLQTIIPDYRNMIGQGA

15 El fragmento de ADN Sec-ID6 que codifica la cadena pesada de Ig gamma-1 de D2E7 puede después someterse a doble digestión por enzimas de restricción ClaI y NotI y ligarse direccionalmente en pIRES-EGFP-T1T2 IgL linealizado por ClaI y NotI, dando como resultado la construcción pIRES-EGFP-T1T2-IgH (Figura 6).

20 Sec-ID6 también se ha modificado por ingeniería genética para contener un sitio de enzima de restricción Eco47III único entre las regiones codificantes variable pesada V y constante C-gamma1 (destacadas en negrita y subrayadas), lo que permite el reemplazo de regiones V-pesadas en esta construcción frente a otras regiones V-pesadas o bibliotecas de V-pesada, usando una enzima de restricción única cadena arriba de la región codificante de V-pesada en la construcción, junto con Eco47III. El ligamiento correcto del inserto puede verificarse por digestión con enzimas de restricción de diagnóstico y/o secuenciación de ADN de la construcción clonada (Figura 6).

La secuencia para el vector de cadena pesada de anticuerpo gamma-1 humano transponible pIRES-EGFP-T1T2-IgH se proporciona en la secuencia Sec-ID8.

Sec-ID8:

5' -

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTGCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAA
GGCAAGGCTTGACCGACAATTGTTAACCCTAGAAAAGATAGTCTGCGTAAAAATTGACGCATGCATTCTTGAAA
TATTGCTCTCTCTTTCTAAATAGCGCGAATCCGTCGCTGTGCATTTAGGACATCTCAGTCGCCGCTTGAGC
TCCCGTGAGGCGTGCTTGTCAATGCCGTAAGTGTCACTGATTTTTGAAGTATAACGACCGCGTGAGTCAAAAT
GACGCATGATTATCTTTTACGTGACTTTTAAAGATTTAACTCATAACGATAATTATATTGTTATTTTCATGTTCT
ACTTACGTGATAACTTATTATATATATATATTTCTTGTATACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGG
CGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG
TAATCAATTACGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC
CCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA
ATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCCAGTAC
ATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGAC
GTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATG
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCC
ACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATC
GATATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCCTTGTGCGATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTG
GTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCCTCTGGATTCCACC
TTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGCTATCACT
TGGAATAGTGGTCACATAGACTATGCGGACTCTGTGGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGATACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTCTCG
TACCTTAGCACCGCGTCTCCCTTACTATTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTTCCACC

AAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCAGCCCTGGGCTGC
 CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
 ACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
 TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
 TTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAG
 ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGAC
 TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAAGCCAAAGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG
 AACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 CACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGAGCTGCAACTGGAGGAGAGCTGTGCGGAGGCG
 CAGGACGGGGAGCTGGACGGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCATCACACTCTTCTGTTAAGCGTGTGC
 TACAGTGCCACCCTCACCTTCTTCAAGGTGAAGTGGATCTTCTCCTCGGTGGTGGACCTGAAGCAGACCATC
 ATCCCCGACTACAGGAACATGATCGGACAGGGGCGCTAGGCGGCCGCGTGCACGGAATTCAGTGGATCCACT
 AGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTAATTCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCCTC
 TCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGG
 CCCGCGGTGATGCCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTG
 AGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
 GTGTCCACTCCCAGGTCCAACCTGCAGGTGAGCATGCATCTAGGGCGGCCAATTCGCCCCCTCTCCCTCCCC
 CCCCCCTAACGTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTGATTTTCCAC
 CATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGG
 TCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTC
 TTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCTTTGACGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCCTCTG
 CGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGAT
 AGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACC
 CCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTAGTCGAGGTTAAAAAACG
 TCTAGGCCCCCCGAACCACGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAACACGATGATAAGCTTGCCACAACCCGGG
 ATCCACCGGTGCCACCATGGTGAAGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGC
 TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC
 TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCT
 ACGGCGTGAGTGTCTCAGCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCG
 AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGT
 TCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGG
 GGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
 AAGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACA
 CCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAG
 ACCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTTCGTGACCGCCCGGGATCACCTCTCGGCATGG

ES 2 528 892 T3

ACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATC
 TGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCATAAAAA
 TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA
 GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAA
 AACGAGCTGGGGCTCGAGGATAAAAGTTTTGTTACTTTATAGAAGAAATTTGAGTTTTTGTTTTTTTTAA
 TAAATAAATAAACATAAAATAAATTGTTTGTGAATTTATTATTAGTATGTAAGTGTAATATAATAAACTT
 AATATCTATTCAAATTAATAAATAAACCTCGATATACAGACCGATAAAACACATGCGTCAATTTTACGCATG
 ATTATCTTTAACGTACGTACAATATGATTATCTTTCTAGGGTTAACTCGAGTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
 TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTGCACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGG
 TCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG
 TGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTCGCTCACTGCCCGCTTCCAG
 TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGG
 CGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGTTCGCTCGGCTCGGTCGTTTCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC
 TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAG
 CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
 CACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCT
 GGAAGCTCCCCTGTCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCG
 GGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTG
 GGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAC
 CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
 GGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCT
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGTGGTAGC
 GGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
 TCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
 ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGG
 TCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTT
 GCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA
 CCGCGAGACCCAGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA
 AGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCG
 CCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATG
 GCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
 AGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
 CTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCA
 TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCTGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACAT
 AGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTG
 TTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTT
 TCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATA
 CTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
 GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC-3'

Los ejemplos 1 y 2 proporcionan los vectores de expresión transponibles humanos básicos para cadenas ligera kappa de anticuerpo humano y ligera gamma-1 humana y por lo tanto para IgG1 humano unido a membrana, de longitud completa.

5

Sec-ID11:

5' -

ATGGGTAGTTCTTTAGACGATGAGCATATCCTCTCTGCTCTTCTGCAAAGCGATGACGAGCTTGTGGTGAG
 GATTCTGACAGTGAATATCAGATCACGTAAGTGAAGATGACGTCCAGAGCGATACAGAAGAAGCGTTTATA
 GATGAGGTACATGAAGTGCAGCCAACGTCAAGCGGTAGTGAATATTAGACGAACAAAATGTTATTGAACAA
 CCAGGTTCTTCATTGGCTTCTAACAGAATCTTGACCTTGCCACAGAGGACTATTAGAGGTAAGAATAAACAT
 TGTGGTCAACTTCAAAGTCCACGAGGCGTAGCCGAGTCTCTGCACCTGAACATTGTGAGATCTCAAAGAGGT
 CCGACGCGTATGTGCCGAATATATATGACCCACTTTTATGCTTCAAATATTTTTACTGATGAGATAATT
 TCGGAAATGTAAAATGGACAAATGCTGAGATATCATTGAAACGTCCGGAATCTATGACAGGTGCTACATTT
 CGTGACACGAATGAAGATGAAATCTATGCTTTCTTTGGTATTCTGGTAATGACAGCAGTGAGAAAAGATAAC
 CACATGTCCACAGATGACCTCTTTGATCGATCTTTGTCAATGGTGTACGTCTCTGTAATGAGTCGTGATCGT
 TTTGATTTTTGATACGATGTCTTAGAATGGATGACAAAAGTATACGGCCACACTTCGAGAAAACGATGTA
 TTTACTCTGTTAGAAAATATGGGATCTCTTATCCATCAGTGCATACAAAATTACACTCCAGGGGCTCAT
 TTGACCATAGATGAACAGTTACTTGGTTTTAGAGGACGGTGTCCGTTTAGGATGTATATCCCAAACAAGCCA
 AGTAAGTATGGAATAAAAATCCTCATGATGTGTGACAGTGGTACGAAGTATATGATAAATGGAATGCCTTAT
 TTGGGAAGAGGAACACAGACCAACGGAGTACCACTCGGTGAATACTACGTGAAGGAGTTATCAAAGCCTGTG
 CACGGTAGTTGTGTAATATTACGTGTGACAATTGGTTTACCTCAATCCCTTTGGCAAAAACCTTACTACAA
 GAACCGTATAAGTTAACCATTGTGGGAACCGTGCATCAAACAAACGCGAGATACCGGAAGTACTGAAAAAC
 AGTCGCTCCAGGCCAGTGGGAACATCGATGTTTTGTTTTGACGGACCCCTTACTCTCGTCTCATATAAACCG
 AAGCCAGCTAAGATGGTATACTTATTATCATCTTGTGATGAGGATGCTTCTATCAACGAAAGTACCGGTAAA
 CCGCAAATGGTTATGTATTATAATCAAATAAAGGCGGAGTGGACACGCTAGACCAAATGTGTTCTGTGATG
 ACCTGCAGTAGGAAGACGAATAGGTGGCCTATGGCATTATTGTACGGAATGATAAACATTGCCTGCATAAAT
 TCTTTTATTATATACAGCCATAATGTCAGTAGCAAGGGAGAAAAGGTTCAAAGTCGCAAAAATTTATGAGA
 AACCTTACATGAGCCTGACGTCATCGTTTATGCGTAAGCGTTTAGAAGCTCCTACTTTGAAGAGATATTTG
 CGCGATAATATCTCTAATATTTTGCCAAATGAAGTGCCTGGTACATCAGATGACAGTACTGAAGAGCCAGTA
 ATGAAAAACGTACTTACTGTACTTACTGCCCTCTAAAATAAGGCGAAAGGCAAATGCATCGTGCAAAAAA
 5 TGCAAAAAGTTATTTGTGCGAGAGCATAATATTGATATGTGCCAAAGTTGTTTTAG-3'

Esta secuencia se traduce en la secuencia de aminoácidos Sec-ID12.

Sec-ID12:

MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDTEEFIDEVHEVQPTSSGSEILDEQN
 VIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTSKSTRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCF
 KLFFTTDEIISEIVKWTNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDNHMSTDDLFD
 RLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDKSI RPTLRENDVFTPVRKIWDLFIHQCIQNYTPGAHLTIDEQ
 LLGFRGRCPFRMYIPNPKSKYGIKILMCDSGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKP
 VHGSCRNITCDNWFTSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTSMFCFDGPLT
 LVSYPKPKPAKMVYLLSSCDEEDASINESTGKPMVMYYNQTKGGVDTLDQMCVMTCSRKTNRWP
 MALLYGMINIACINSFIYSHNVSSKGEKVQSRKKFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPT LKRYLRDNI SNI
 LPNEVPGTSDDSTEPEVMKKRTYCTYCPSKI RRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQSC

Para generar un vector de expresión de células de vertebrados para la enzima transposasa *PiggyBac*, esta ORF puede sintetizarse de forma génica y clonarse como un ADN de extremos romos en el sitio de enzima de restricción de corte romo, único, EcoRV en el vector de expresión de células de vertebrados convencional pCDNA3.1-hygro(+)

(número de catálogo V870-20, *Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos*), por métodos conocidos en la técnica. El ligamiento correcto de la ORF *PiggyBac*, en relación con el promotor pCDNA3 puede verificarse por digestión con enzimas de restricción de diagnóstico y/o por secuenciación de ADN de la construcción de expresión de *PiggyBac* clonada pCDNA3.1-hygro(+)-PB (Figura 7).

5 La secuencia de la construcción de expresión de *PiggyBac* pCDNA3.1-hygro(+)-PB se proporciona en SEC-ID13, a continuación:

Sec-ID13:

10

```
5' -          GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT
GCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCCGAGCAAAATT
TAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTG
CTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG
```

GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGA
 CCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC
 CATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA
 AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGG
 GACTTTCCACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTAC
 ATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGT
 TTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCCGCCCCATTGACGCAAATGGGC
 GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAAC TAGAGAACCCTGCTTACTGG
 CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCG
 AGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATGGGTAGTTCCTTAGACGATGAGCATATCC
 TCTCTGCTCTCTGCAAAGCGATGACGAGCTTGTGGTGAGGATTCTGACAGTGAAATATCAGATCACGTAA
 GTGAAGATGACGTCCAGAGCGATACAGAAGAAGCGTTTATAGATGAGGTACATGAAGTGCAGCCAACGTCAA
 GCGGTAGTGAAATATTAGACGAACAAAATGTTATTGAACAACCAGGTTCTTCATTGGCTTCTAACAGAACT
 TGACCTTGCCACAGAGGACTATTAGAGGTAAGAATAAACATTGTTGGTCAACTTCAAAGTCCACGAGGCGTA
 GCCGAGTCTCTGCACTGAACATTGTCAGATCTCAAAGAGGTCCGACGCGTATGTGCCGCAATATATATGACC
 CACTTTTATGCTTCAAACATTTTTTACTGATGAGATAATTTCCGAAATGTAAAATGGACAAATGCTGAGA
 TATCATTGAAACGTCCGGAATCTATGACAGGTGCTACATTTCTGTGACACGAATGAAGATGAAATCTATGCTT
 TCTTTGGTATTCTGGTAATGACAGCAGTGAGAAAAGATAACCACATGTCCACAGATGACCTCTTTGATCGAT
 CTTTGTCAATGGTGACGTCTCTGTAATGAGTCGTGATCGTTTTGATTTTTGATACGATGTCTTAGAATGG
 ATGACAAAAGTATACGGCCCACTTCGAGAAAACGATGTATTTACTCCTGTAGAAAAATATGGGATCTCT
 TTATCCATCAGTGCATACAAAATTACACTCCAGGGGCTCATTTGACCATAGATGAACAGTTACTTGGTTTTA
 GAGGACGGTGTCCGTTTAGGATGTATATCCCAAAACAAGCCAAGTAAGTATGGAATAAAAATCCTCATGATGT
 GTGACAGTGGTACGAAGTATATGATAAATGGAATGCCTTATTTGGGAAGAGGAACACAGACCAACGGAGTAC
 CACTCGGTGAATACTACGTGAAGGAGTTATCAAAGCCTGTGCACGGTAGTTGTGCGTAATATTACGTGTGACA
 ATTGGTTCACCTCAATCCCTTTGGCAAAAACTTACTACAAGAACCGTATAAGTTAACCATTGTGGGAACCG
 TGCGATCAAACAAACGCGAGATACCGGAAGTACTGAAAAACAGTCGCTCCAGGCCAGTGGGAACATCGATGT
 TTTGTTTTGACGGACCCCTTACTCTCGTCTCATATAAACCGAAGCCAGCTAAGATGGTATACTTATTATCAT
 CTTGTGATGAGGATGCTTCTATCAACGAAAGTACCGGTAACCGCAAATGGTTATGTATTATAATCAAAC TA
 AAGGCGGAGTGGACACGCTAGACCAAATGTGTTCTGTGATGACCTGCAGTAGGAAGACGAATAGGTGGCCTA
 TGGCATTATTGTACGGAATGATAAACATTGCCTGCATAAATCTTTTTATTATATACAGCCATAATGTCAGTA
 GCAAGGGAGAAAAGGTTCAAAGTCGCAAAAAATTTATGAGAAACCTTTACATGAGCCTGACGTCATCGTTTA
 TGCGTAAGCGTTTAGAAGCTCCTACTTTGAAGAGATATTTGCGCGATAATATCTCTAATATTTTGCCAAATG
 AAGTGCCTGGTACATCAGATGACAGTACTGAAGAGCCAGTAATGAAAAACGTACTIONACTGTACTTACTGCC
 CCTCTAAAATAAGGCGAAAGGCAAATGCATCGTGCAAAAAATGCAAAAAAGTTATTTGTGAGAGCATAATA
 TTGATATGTGCCAAAGTTGTTTTAGATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTAAACC
 CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCGTCCTTCTTG
 ACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG
 TGTCATTCATCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT
 GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCAC
 GCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC

GCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCT
 CTAATCGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAG
 GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTT
 TTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAA
 GGGATTTTGGGGATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTC
 TGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCC
 GCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAG
 CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATA
 TCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGAAAAAGCCTGAACTCACCAGCAGCTCTGTGAGAAAGTTTCTG
 ATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGTCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTC
 GATGTAGGAGGGCGTGATATGTCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTT
 TATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCCTTGACATGGGGAATTCAGCGAGAGCCTG
 ACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAAGTCCCGCTGTT
 CTGCAGCCGGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCA
 TTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTG
 TATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTT
 TGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTGCGCTCCAACAATGTCTGACGGAC
 AATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGGGATGTTGCGGGATTTCCAATACGAGGTCCGCAAC
 ATCTTCTTCTGGAGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAG
 CTTGACAGGATCGCCCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTT
 GACGGCAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTGCATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACT
 GTCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGCTGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGAT
 AGTGGAAACCGACGCCCGCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGCACGTGCTACGAGATTTTCGATTCCACC
 GCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGG
 GATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAAT
 AGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAAT
 GTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCT
 GTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGT
 GCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCG
 TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCC
 TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATA
 CGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAAC
 CGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC
 TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTG
 CGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
 TCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAA
 CCCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGAC
 TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTC

TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTT
 ACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGT
 TGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGAC
 GCTCAGTGGAAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC
 CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
 TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCCGTC
 GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGC
 TCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACT
 TTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTG
 CGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCC
 GGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTT
 CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
 ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCAATTCTGAGAATAGTGT
 ATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
 GTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCG
 ATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
 ACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTT
 TTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAA
 AATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC - 3'

Con la compleción del Ejemplo 4, todas las construcciones genéticas están disponibles para realizar el método desvelado en el presente documento.

5 **Ejemplo 5:** Clonación del vector de expresión de cadena ligera transponible para cadenas ligeras kappa de anticuerpo humano compatibles con la enzima transposasa *Sleeping Beauty*.

10 Para transponer vectores de expresión de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana contenidos en un vector transponible independientemente en células hospedadoras, puede construirse una construcción de cadena ligera de inmunoglobulina transponible con diferentes secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) que se reconocen por la transposasa *Sleeping Beauty*.

15 Para esto, puede usarse el vector de expresión de cadena ligera kappa de Ig humana pIRES-EGFP-T1T2-IgL (Sec-ID5) del ejemplo 1 para reemplazar las ITR 5' y 3' del sistema de transposón *PiggyBac*, contenido en este vector, con las ITR 5' y 3' del sistema de transposón *Sleeping Beauty*. Las secuencias para la ITR 5' e ITR 3' de *Sleeping Beauty*, reconocidas y funcionales con la transposasa *Sleeping Beauty*, pueden recuperarse del documento de Patente US7160682B1.

20 La secuencia de ITR de *Sleeping Beauty* cadena arriba con la repetición 5' terminal tiene que sintetizarse de forma génica con secuencias de enzimas de restricción MunI flanqueantes, que permiten el reemplazo de la ITR 5' *PiggyBac* flanqueada por MunI en la construcción pIRES-EGFP-T1T2-IgL (Sec-ID-5) del ejemplo 1 por la secuencia de ITR 5' de *Sleeping Beauty*. Esta secuencia es la siguiente (los sitios de la enzima de restricción MunI están destacados en negrita y 4 nucleótidos aleatorios flanqueantes adicionales, que permiten la digestión de enzima de restricción apropiada del fragmento sintetizado de forma génica, se indican en minúscula):

Sec-ID14:

5'-

atat**CAATTG**AGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAA
 AACTCGTTTTTCAACTACACCACAAATTTCTTGTTAACAAACAATAGTTTTGG
 CAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGTCATTTTTCCAACAA
 TTGTTTACAGACAGATTATTTCACTTATAATTCAGTGTATCACAATTCAGTGG
 GTCAGAAGTTTACATACACTAAC**CAATTG**at-3'

La secuencia de ITR de *Sleeping Beauty* cadena abajo con la repetición 3' terminal (también publicada en el documento US7160682B1) tiene que sintetizarse de forma génica con las secuencias de la enzima de restricción XhoI flanqueantes, permitiendo el reemplazo de la ITR 3' de *PiggyBac* flanqueada por XhoI en la construcción pIRES-EGFP-T1T2-IgL (Sec-ID-5) del ejemplo 1 por la secuencia de ITR 3' de *Sleeping Beauty*. Esta secuencia es la siguiente (Los sitios de enzimas de restricción XhoI están destacados en negrita y 4 nucleótidos aleatorios flanqueantes adicionales, que permiten la digestión con enzimas de restricción apropiada del fragmento sintetizado de forma génica, se indican en minúscula):

Sec-ID15:

5'-

atat**CTCGAG**TTGAGTGTATGTTAACTTCTGACCCACTGGGAATGTGATGAAAG
 AAATAAAAGCTGAAATGAATCATTCTCTCTACTATTATTCTGATATTTACAT
 TCTTAAAATAAAGTGGTGATCCTAACTGACCTTAAGACAGGGAATCTTTACTC
 GGATTAATGTCAGGAATTGTGAAAAAGTGAGTTTAAATGTATTTGGCTAAG
 GTGTATGTAACTTCCGACTTCAACT**CTCGAG**atat-3'

En una primera etapa, la ITR 5' de *PiggyBac* flanqueada por MnlI de la construcción pIRES-EGFP-T1T2-IgL (Sec-ID-5) tiene que reemplazarse por la ITR 5' de *Sleeping Beauty* digiriendo pIRES-EGFP-T1T2-IgL (Sec-ID-5) con enzima de restricción MnlI y ligando el fragmento sintetizado de forma génica digerido con MnlI de Sec-ID-14 con la cadena principal del vector linealizado por MnlI de pIRES-EGFP-T1T2-IgL (Sec-ID-5). El reemplazo apropiado y la orientación correcta de la ITR 5' de *Sleeping Beauty* puede comprobarse por digestiones con enzima de restricción de diagnóstico y/o secuenciación de ADN. El plásmido resultante se denomina pIRES-EGFP-sbT1-PBT2-IgL (Figura 8).

En una segunda etapa, la ITR 3' de *PiggyBac* flanqueada por XhoI de la construcción aún contenida en pIRES-EGFP-sbT1-PBT2-IgL tiene que reemplazarse por la ITR 3' de *Sleeping Beauty* digiriendo pIRES-EGFP-sbT1-PBT2-IgL con enzimas de restricción XhoI y ligando el fragmento de síntesis génica digerido con XhoI de Sec-ID-15 en la cadena principal del vector linealizado por XhoI de pIRES-EGFP-sbT1-PBT2-IgL. El reemplazo apropiado y la orientación correcta de ITR 3' de *Sleeping Beauty* puede comprobarse por digestiones con enzimas de restricción de diagnóstico y/o secuenciación de ADN. El plásmido resultante se denomina pIRES-EGFP-sbT1T2-IgL (Figura 8).

La secuencia completa del vector de expresión de LC kappa de Ig humano pIRES-EGFP-sbT1T2-IgL transponible por la transposasa *Sleeping Beauty* se proporciona en Sec-ID-16:

Sec-ID16:

5'-

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGC
 TCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGT
 CGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACC
 GACAATTGAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAA
 AACTCGTTTTTCAACTACACCACAAATTTCTTGTTAACAACAATAGTTTTGG
 CAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGTCATTTTTCCAACAA
 TTGTTTACAGACAGATTATTTCACTTATAATTCAGTGTATCACAATTCCAGTGG
 GTCAGAAGTTTACATACACTAACAAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAG
 GCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGAT
 TATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCA
 TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC

GCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA
 CGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACT
 GCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
 CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT
 GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG
 GTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG
 GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACC
 AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCA
 AATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGG
 CTAAGTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTA
 TAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCGATatggacatgagggtccctgctcag
 ctctgggactcctgctgctgctggctcccaggtgccagatgtGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC
 TCCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTCACCATCACTTGTTCGGGCAAGTCA
 GGGCATCAGAAATTAAGCTTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCT
 AAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTT
 CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAG
 CCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGGTATAACCGTGCACCGTATAC
 TTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAGCGCTCTGTGGCTGCACCATCT
 GTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGT
 TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG
 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC
 AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
 AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAAATCTGCGGCC
 GCGTCGACGGAATTCAGTGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAA
 TTAATTCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAA
 GCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATT
 TGATATTCACCTGGCCCGCGGTGATGCCTTTGAGGGTGGCCGCGTCCATCTGG
 TCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGAT
 CTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG
 TGTCCACTCCAGGTCCAACCTGCAGGTGAGCATGCATCTAGGGCGGCCAATT
 CCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAAT

AAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTGATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTG
 GCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGG
 GGTCTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGA
 AGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTT
 GCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCC
 ACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTG
 AGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACA
 AGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGG
 GCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAG
 GCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAAGC
 TTGCCACAACCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
 GCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC
 GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
 AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
 ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGA
 CCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
 CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
 AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT
 CGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTAC
 AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG
 TGA ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGA
 CCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
 AACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGC
 GCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGC
 ATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA
 CTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCGTGCCTTCCTT
 GACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTG
 CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAG
 GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG
 GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGTTGAG
 TGTATGTTAACTTCTGACCCACTGGGAATGTGATGAAAGAAATAAAAGCTGA
 AATGAATCATTCTCTACTATTATTCTGATATTTACATTCTTAAATAAAGT

GGTGATCCTAACTGACCTTAAGACAGGGAATCTTTACTCGGATTAATGTCAG
GAATTGTGAAAAAGTGAGTTTAAATGTATTTGGCTAAGGTGTATGTAACTTC
CGACTTCAACTCTCGAGTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATG
TATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCA
TGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAA
CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC
TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCT
GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTG
CGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAA
AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAC
CCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT
CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG
TAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACAGCCCGA
CCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTA
GAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT
TTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTT
AAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTA
AATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTC
TGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT
TTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGG
GAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCT
CACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCG
CAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCC

ATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAG
 CTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA
 AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCA
 GTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC
 ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG
 AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAA
 TACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTT
 CGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTA
 ACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTC
 TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGC
 GACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCA
 TTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAA
 AATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACG
 TC-3'

Ejemplo 6: Clonación de un vector de expresión de *Sleeping Beauty*

- 5 La fase abierta de lectura (ORF) de la enzima transposasa *Sleeping Beauty* también puede encontrarse en la referencia de Patente US7160682B 1/US2003154500A1.

Esta secuencia se proporciona en la Sec-ID17, a continuación:

10 Sec-ID17:

5'-

ATGGGAAAATCAAAGAAATCAGCCAAGACCTCAGAAAAAAATTGTAGAC
 CTCCACAAGTCTGGTTCATCCTTGGGAGCAATTTCCAAACGCCTGAAAGTACC
 ACGTTCATCTGTACAAACAATAGTACGCAAGTATAAACACCATGGGACCACG
 CAGCCGTCATACCGCTCAGGAAGGAGACGCGTTCTGTCTCCTAGAGATGAAC
 GTACTTTGGTGCGAAAAGTGCAAATCAATCCCAGAACAACAGCAAAGGACCT
 TGTGAAGATGCTGGAGGAAACAGGTACAAAAGTATCTATATCCACAGTAAAA
 CGAGTCCTATATCGACATAACCTGAAAGGCCGCTCAGCAAGGAAGAAGCCAC
 TGCTCCAAAACCGACATAAGAAAGCCAGACTACGGTTTGCAACTGCACATGG
 GGACAAAGATCGTACTTTTTGGAGAAATGTCCTCTGGTCTGATGAAACAAAA

ATAGAACTGTTTGGCCATAATGACCATCGTTATGTTTGGAGGAAGAAGGGGG
 AGGCTTGCAAGCCGAAGAACACCATCCCAACCGTGAAGCACGGGGGTGGCA
 GCATCATGTTGTGGGGGTGCTTTGCTGCAGGAGGGACTGGTGCCTTCACAA
 AATAGATGGCATCATGAGGAAGGAAAATTATGTGGATATATTGAAGCAACAT
 CTCAAGACATCAGTCAGGAAGTTAAAGCTTGGTCGCAAATGGGTCTTCCAAA
 TGGACAATGACCCCAAGCATACTTCCAAAGTTGTGGCAAATGGCTTAAGGA
 CAACAAAGTCAAGGTATTGGAGTGGCCATCACAAAGCCCTGACCTCAATCCT
 ATAGAAAATTTGTGGGCAGAACTGAAAAAGCGTGTGCGAGCAAGGAGGCCT
 ACAAACCTGACTCAGTTACACCAGCTCTGTCAGGAGGAATGGGCCAAAATTC
 ACCCAACTTATTGTGGGAAGCTTGTGGAAGGCTACCCGAAACGTTTGACCCA
 AGTTAAACAATTTAAAGGCAATGCTACCAAATACTAG-3'

Esta secuencia se traduce en la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 Sec-ID18:

MGKSKEISQDLRKKIVDLHKSGSSLGAISKRLKVPRSSVQTIVRKYKHHGT
 TQPSYRSGRRRVLSPRDERTLVRKVQINPRTTAKDLVKMLEETGTKVSISTVKRV
 LYRHNLKGRSARKKPLLQNRHKKARLRFATAHGDKDRTFWRNVLWSDETKIEL
 FGHNDHRYVWRKKGEACKPKNTIPTVKHGGGSIMLWGCFAAGGTGALHKIDGI
 MRKENYVDILKQHLKTSVRKLLGRKWVWFQMDNDPKHTSKVVAKWLDNKV
 KVLEWPSQSPDLNPIENLWAEKLRVRARRPTNLTQLHQLCQEEWAKIHPTYCG
 KLVEGYPKRLTQVKQFKGNATKY•

10 Para generar un vector de expresión de células de vertebrados para la enzima transposasa *Sleeping Beauty*, esta ORF puede sintetizarse de forma génica y clonarse como un ADN de extremos romos en el sitio de enzima de restricción de corte romo, único, EcoRV en el vector de expresión de células de vertebrados convencional pCDNA3.1-hygro(+) (número de catálogo V870-20, *Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos*), por técnicas conocidas en este campo. El ligamiento correcto de la ORF de *Sleeping Beauty*, en relación con el promotor de pCDNA3 puede verificarse por digestión con enzimas de restricción de diagnóstico, y/o por secuenciación de ADN
 15 de la construcción de expresión de *Sleeping Beauty* clonada pCDNA3.1-hygro(+)-SB (Figura 9).

La secuencia de la construcción de expresión de *Sleeping Beauty* pCDNA3.1-hygro(+)-SB se proporciona en Sec ID-19, a continuación:

20

Sec-ID19:

5'-

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGC
TCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGT
CGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACC
GACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGA
TGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT
AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA
TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATT
GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC
CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA
CATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACC
CCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCA
AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGC
TACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCT
AGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGT
GGAATTCTGCAGATATGGGAAAATCAAAGAAATCAGCCAAGACCTCAGAA
AAAAAATTGTAGACCTCCACAAGTCTGGTTCATCCTTGGGAGCAATTTCCAAA
CGCCTGAAAGTACCACGTTTCATCTGTACAAACAATAGTACGCAAGTATAAAC
ACCATGGGACCACGCAGCCGTCATACCGCTCAGGAAGGAGACGCGTTCTGTC
TCCTAGAGATGAACGTACTTTGGTGCGAAAAGTGCAAATCAATCCCAGAACA
ACAGCAAAGGACCTTGTGAAGATGCTGGAGGAAACAGGTACAAAAGTATCTA
TATCCACAGTAAAACGAGTCCTATATCGACATAACCTGAAAGGCCGCTCAGC
AAGGAAGAAGCCACTGCTCCAAAACCGACATAAGAAAGCCAGACTACGGTTT
GCAACTGCACATGGGGACAAAGATCGTACTTTTTGGAGAAATGTCCTCTGGTC
TGATGAAACAAAATAGAAGTGTGGCCATAATGACCATCGTTATGTTTGA
GGAAGAAGGGGGAGGCTTGCAAGCCGAAGAACACCATCCCAACCGTGAAGC

ACGGGGGTGGCAGCATCATGTTGTGGGGGTGCTTTGCTGCAGGAGGGACTGG
TGCACTTCACAAAATAGATGGCATCATGAGGAAGGAAAATTATGTGGATATA
TTGAAGCAACATCTCAAGACATCAGTCAGGAAGTTAAAGCTTGGTCGCAAAT
GGGTCTTCCAAATGGACAATGACCCAAGCATACTTCCAAAGTTGTGGCAAA
ATGGCTTAAGGACAACAAAGTCAAGGTATTGGAGTGGCCATCACAAAGCCCT
GACCTCAATCCTATAGAAAATTTGTGGGCAGAACTGAAAAAGCGTGTGCGAG
CAAGGAGGCCTACAAACCTGACTCAGTTACACCAGCTCTGTCAGGAGGAATG
GGCCAAAATTCACCCAACCTATTGTGGGAAGCTTGTGGAAGGCTACCCGAAA
CGTTTGACCCAAGTTAAACAATTTAAAGGCAATGCTACCAAATACTAGATCC
AGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCA
GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTG
CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGA
GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTG
GGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTC
TAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTG
GTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCC
TTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTCCCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
CCCCAAAAAATTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGAT
AGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTAT
AAGGGATTTTGGGGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA
AAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAA
GTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTA
GTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATG
CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCC
CATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC
TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCC
AGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCC
GGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGAAAAAGCCTG
AACTCACCGCGACGTCTGTGCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGT

CTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCG
ATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTT
CTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTC
CGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCC
CGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCG
CTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTT
AGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGACCAGCAAGGAATCGGTCAATACA
CTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGG
CAAACGTGATGGACGACACCGTACAGTGCCTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATG
AGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGACGC
GGATTTTCGGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTC
ATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTTCGGGGATTCCAATACGAGGTCGCCAACA
TCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTC
GAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGC
TCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTCGAT
GATGCAGCTTGGGCGCAGGGTTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCG
GGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGCTCTGGACCGA
TGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGT
CCGAGGGCAAAGGAATAGCACGTGCTACGAGATTCGATTCCACCGCCGCCT
TCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATC
CTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCCAACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAAT
AAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTA
TCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATG
GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCG
TATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCG
GCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAG
GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC

CCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG
ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTC
TCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGG
AAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGC
TGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA
GGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTT
TGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAG
GATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATT
AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGAC
AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG
GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAA
GTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA
GCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCG
GTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGC
GGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGT
TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCC
GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACC
GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGG
GGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCC
ACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGG
TGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACA
CGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
ACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC-3'

Ejemplo 7: Generación de una biblioteca de expresión de cadena ligera kappa Ig humana transponible *Sleeping Beauty*

5 Para generar una biblioteca de ADN transponible de *Sleeping Beauty* diversa que codifica bibliotecas de cadena ligera de anticuerpo humano, es necesario reemplazar la región VL del vector transponible de *Sleeping Beauty* pIRES-EGFP-sbT1T2-IgL del Ejemplo 5 con un repertorio de genes VL diverso. Esto puede realizarse sintetizando de forma génica regiones codificantes de VL humana flanqueadas por sitios de enzimas de restricción ClaI y Eco47III, y permitiendo variaciones de nucleótidos en ciertas posiciones de HCDR y LCDR, como ya se ha proporcionado en Sec-ID-10 anteriormente. La secuencia Sec-ID10 está flanqueada por enzimas de restricción ClaI y Eco47III que permiten el ligamiento dirigido en pIRES-EGFP-sbT1T2-IgL linealizado con ClaI-Eco47III. De esta manera puede generarse una biblioteca de ADN transponible de *Sleeping Beauty* que codifica diversas cadenas ligeras de anticuerpo humano.

15 De esta manera, pueden generarse bibliotecas de ADN transponible diversas, que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo en vectores separados, en las que la expresión de las cadenas de anticuerpo está unida de forma transcripcional y por lo tanto operativa a una proteína marcadora verde fluorescente.

20 Habiendo generado vectores de expresión de cadena IgH humana transponible de *PiggyBac* (Ejemplo 2) y vectores de expresión de biblioteca de cadena IgH humana (Ejemplo 3), así como vectores de expresión transponibles de *Sleeping Beauty* para cadenas IgL humanas (Ejemplo 5) y bibliotecas de cadenas IgL humanas (Ejemplo 7), y habiendo además proporcionado los vectores de expresión de vertebrados las transposasas *PiggyBac* y *Sleeping Beauty* (Ejemplos 4 y 6, respectivamente), se permite la realización de la invención por transposición independiente de vectores de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina en células hospedadoras usando dos sistemas de transposición separados, si se siguen métodos de biología celular y biología molecular convencionales, que incluyen el cultivo de células hospedadoras de vertebrados o mamíferos *in vitro*, su transfección con las construcciones anteriormente mencionadas por métodos conocidos en la técnica, de modo que se produzca transposición estable de las construcciones y se efectúe expresión de los polipéptidos de interés de esas construcciones, seguido de técnicas de exploración y separación de células convencionales con respecto a unión o función deseadas de las proteínas expresadas, y, en último lugar, seguido de la identificación de las secuencias codificantes de construcciones transpuestas contenidas en el células seleccionadas por métodos genómicos o de RT-PCR convencionales en combinación con secuenciación de ADN convencional o de siguiente generación.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Grawunder, Ulf
- <120> Identificación mediada por transposición de proteínas de unión específica o funcionales
- <130> ND 40268
- 40 <160> 19
- <170> PatentIn versión 3.3
- 45 <210> 1
- <211> 327
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> Secuencia de ITR de PiggyBac cadena arriba con secuencias de reconocimiento de enzima de restricción MunI flanqueantes y 4 nucleótidos en los extremos 5' y 3' para facilitar la digestión con enzima de restricción
- <400> 1

55

```

atatcaattg ttaaccctag aaagatagtc tgcgtaaaat tgacgcatgc attcttgaaa      60
tattgctctc tctttctaaa tagcgcgaat ccgtcgctgt gcatttagga catctcagtc      120
gccgcttgga gctcccggtga ggcgtgcttg tcaatgcggg aagtgtcact gattttgaac      180
tataacgacc gcgtgagtca aatgacgca tgattatctt ttacgtgact ttaagattt      240
aactcatacg ataattatat tgttatttca tgttctactt acgtgataac ttattatata      300
tatattttct tgttatacaa ttgatat      327

```

ES 2 528 892 T3

<210> 2
 <211> 264
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ITR de PiggyBac cadena abajo con secuencias de reconocimiento de enzima de restricción XhoI flanqueante y 4 nucleótidos en los extremos 5' y 3' para facilitar la digestión con enzima de restricción

10

<400> 2

```

atatctcgag ttaaccctag aaagataatc atattgtgac gtacgttaa gataatcatg      60
cgtaaaattg acgcatgtgt tttatcggtc tgtatatcga ggtttattta ttaattgaa      120
tagatattaa gttttattat atttacactt acatactaat aataaattca acaaacaatt      180
tatttatggt tattttattta ttaaaaaaaaa acaaaaactc aaaatttctt ctataaagta      240
acaaaacttt tatcctcgag atat                                             264

```

15

<210> 3
 <211> 711
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Región codificante de cadena ligera kappa de Ig humana de longitud de completa, incluyendo región codificante de VL de D2E7 y región codificante de cadena ligera kappa constante humana

<400> 3

```

atggacatga gggtcocctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccaggtgcc      60
agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tccctcctgt ctgcatctgt aggggacaga      120
gtcaccatca cttgtcgggc aagtcagggc atcagaaatt acttagcctg gtatcagcaa      180
aaaccagggg aagcccctaa gctcctgatc tatgctgcat ccactttgca atcaggggctc      240
ccatctcggg tcagtgccag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagccta      300
cagcctgaag atggtgcaac ttattactgt caaaggtata accgtgcacc gtatactttt      360
ggccagggga ccaaggtgga aatcaagcgc tctgtggctg caccatctgt cttcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaggtct acgcctgoga agtcacccat      660
cagggcctga gctcgcocct cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a              711

```

25

<210> 4
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia proteica de cadena ligera kappa de Ig humana de longitud completa, codificada por la región codificante de VL de D2E7 y región codificante de cadena ligera kappa constante humana.

<400> 4

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg
 100 105 110

Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

ES 2 528 892 T3

<210> 5
 <211> 6436
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> pIRES-EGFP-T1T2-IgL

10

<400> 5

```

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg      60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgttaa ccctagaaag      180
atagtctgcg taaaattgac gcatgcattc ttgaaatatt gctctctctt tctaaatagc      240
gcgaaatccgt cgctgtgcat ttaggacatc tcagtcgccg cttggagctc ccgtgaggcg      300
tgcttgtcaa tgcggtaagt gtcactgatt ttgaaactata acgaccgctg gactcaaaat      360
gacgcatgat tatcttttac gtgactttta agatttaact catacgataa ttatattgtt      420
atctcatggt ctacttacgt gataacttat tatatatata ttttcttggt atacaattgc      480
atgaagaatc tgcttagggt taggcgtttt gogctgcttc gcgatgtacg ggccagatat      540
acgcgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt      600
    
```

ES 2 528 892 T3

catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga 660
 ccgcccacag acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 720
 atagggactt tocattgacg tcaatgggtg gactatttac ggtaaactgc ccacttgcca 780
 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaattgg 840
 cccgcctggc attatgcccga gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc 900
 tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt 960
 ggatagcggg ttgactcaog gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt 1020
 ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgcgccattg 1080
 acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tctctggcta 1140
 actagagaac ccactgctta ctggcttatc gaaattaata cgactcacta tagggagacc 1200
 caagcttggg accgagctcg gatcgatag gacatgaggg tccttctca gctcctggga 1260
 ctcttctgc tctggctccc aggtgccaga tgtgacatcc agatgacca gtctccatcc 1320
 tccttctctg catctgtagg ggacagagtc accatcactt gtcgggcaag tcagggcatc 1380
 agaaattact tagcctggta tcagcaaaaa ccagggaaag cccctaagct cctgatctat 1440
 gctgcatcca ctttgaatc aggggtccca tctcggttca gtggcagtgg atctgggaca 1500
 gatttcactc tcaccatcag cagcctacag cctgaagatg ttgcaactta ttactgtcaa 1560
 aggtataacc gtgcaccgta tacttttggc caggggacca aggtggaaat caagcgtctt 1620
 gtggctgcac catctgtctt catcttccc ccatctgatg agcagttgaa atctggaact 1680
 gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag 1740
 gtggataacg cctccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag 1800
 gacagcacct acagcctcag cagcacctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac 1860
 aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcctgtcac aaagagcttc 1920
 aacaggggag agtgtaaat ctgcggccgc gtcgacggaa ttcagtggat ccactagtaa 1980
 cggccgccag tgtgctggaa ttaattcgt gtctgcgagg gccagctgtt ggggtgagta 2040
 ctccctctca aaagcgggca tgacttctgc gctaagattg tcagtttcca aaaacgagga 2100
 ggatttgata ttcacctggc ccgcgggtgat gcctttgagg gtggccgctt ccatctggtc 2160
 agaaaagaca atctttttgt tgtcaagctt gaggtgtggc aggcttgaga tctggccata 2220
 cacttgagtg acaatgacat ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca ctcccaggtc 2280
 caactgcagg tcgagcatgc atctaggcg gccaaatccg cccctctccc tcccccccc 2340
 ctaacgttac tggcgaagc cgcttggaa aaggccgggtg tgcgtttgtc tatatgtgat 2400
 tttccaccat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct 2460
 tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc tcgccaaagg aatgcaaggt ctgttgaatg 2520

ES 2 528 892 T3

tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct gtagogaccc 2580
 tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg 2640
 tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtgcc a cgttgtgagt tggatagttg 2700
 tggaaagagt caaatggctc tctcaagcg tattcaaca ggggctgaag gatgcccaga 2760
 aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg ggcctcggg cacatgcttt acatgtgttt 2820
 agtcgaggtt aaaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtgggt ttcttttgaa 2880
 aaacacgatg ataagcttgc cacaaccgg gatccaccgg tgcaccat ggtgagcaag 2940
 ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgcc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac 3000
 ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggggatg ccacctacgg caagctgacc 3060
 ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgdcct ggcccaccct cgtgaccacc 3120
 ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccocgacc acatgaagca gcacgacttc 3180
 ttcaagtccg ccatgccoga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac 3240
 ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc 3300
 gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcaca gctggagtac 3360
 aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg 3420
 aacttcaaga tccgccaca catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga cactaccag 3480
 cagaacaccc ccatcgccga cggccccgtg ctgctgccc acaaccacta cctgagcacc 3540
 cagtccgcc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc 3600
 gtgaccgcc cgggatcac tctcgcatg gacgagctgt acaagtaaag cggccctaga 3660
 gctcgtgat cagcctcgac tgtgcctcta gttgccagcc atctgttgtt tgcctccc 3720
 ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcc cccccactgt cctttcctaa taaaatgagg 3780
 aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg 3840
 acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcy gtgggtcta 3900
 tggcttctga ggcgaaaga accagctggg gctcgaggat aaaagtttg ttactttata 3960
 gaagaaattt tgagttttg tttttttta ataaataat aaacataaat aaattgtttg 4020
 ttgaatttat tattagtatg taagtgtaaa tataataaaa cttaatatct attcaaatta 4080
 ataaataaac ctcgatatac agaccgataa aacacatgcy tcaattttac gcatgattat 4140
 ctttaacgta cgtcacaata tgattatctt tctagggta actcgagtgc attctagttg 4200
 tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgt ataccgtoga cctctagcta 4260
 gagcttggcg taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgttatc cgctcacaat 4320
 tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtcct aatgagtgag 4380
 ctaactcaca ttaattgcyt tgcgctcact gcccgcttc cagtcgggaa acctgtcgtg 4440

ES 2 528 892 T3

ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagagggc ggtttgcgta ttggggcgctc 4500
ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc 4560
agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 4620
catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt 4680
tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 4740
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcg 4800
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 4860
cgtggcgctt tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtag tcggtcgctc 4920
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccagc cgctgcgcct tatccggtaa 4980
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 5040
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc 5100
taactacggc tacaactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 5160
cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg 5220
ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 5280
gatctttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgtaag ggattttggt 5340
catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat gaagttttaa 5400
atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 5460
ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tcccogtct 5520
gtagataact acgatacggg agggttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg 5580
agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga 5640
gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 5700
agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg 5760
catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc 5820
aaggcgagtt acatgatccc ccatggttg caaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 5880
gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 5940
taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac 6000
caagtcatc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccg cgtaatacg 6060
ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc 6120
ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg 6180
tgcaccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 6240
aggaaggcaa aatgcocgaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat 6300
actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggg tattgtctca tgagcggata 6360

catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgogcacat ttccccgaaa 6420

agtgccacct gacgtc 6436

5 <210> 6
<211> 1642
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Región codificante de cadena pesada de Ig gamma1 humana de longitud completa, que incluye región codificante de VH de D2E7 y región codificante de cadena pesada gamma1 constante humana con región codificante transmembrana de Ig gamma1 humana, flanqueada por sitios de enzimas de restricción ClaI y NotI y 4 nucleótidos en los extremos 5' y 3' para facilitar la digestión con enzimas de restricción.

<400> 6

ES 2 528 892 T3

aattatcgat atggagtttg ggctgagctg ggttttcott gttgcgattt tagaagggtgt 60
 ccagtgtgag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggottg gtacagcccg gcaggtccct 120
 gagactctoc tgtgcggcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtcog 180
 gcaagctcca ggaagggcc tggaatgggt ctacagctatc acttggaata gtggtcacat 240
 agactatgag gactctgtgg agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc 300
 cctgtatctg caaatgaaca gtctgagagc tgaggatacg gccgtatatt actgtgagaa 360
 agtctcgtac cttagcaccg cgtcctccct tgactattgg ggccaaggta ccctggctcac 420
 cgtctcagc gcttccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag 480
 cacctctggg ggcacagcag ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt 540
 gacgggtgtc tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct 600
 acagtctca ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg 660
 caccagacc tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa 720
 agttgagccc aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc aogtgcccag cacctgaact 780
 cctgggggga ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc 840
 cgggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa 900
 gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga 960
 gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct 1020
 gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa 1080
 aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc 1140
 ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc 1200
 cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac 1260
 gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa 1320
 gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa 1380
 ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tccggagctg caactggagg agagctgtgc 1440
 ggaggcgcag gacggggagc tggacgggct gtggacgacc atcaccatct tcatcacact 1500
 cttcctgta agcgtgtgct acagtgccac cgtcaccttc ttcaaggtga agtggatctt 1560
 ctctcggty gtggacctga agcagaccat catccccgac tacaggaaca tgatcggaca 1620
 gggggcctag gcggccgct cg 1642

<210> 7
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia proteica de cadena pesada de Ig gamma1 humana de longitud completa unida a membrana, codificada por la región codificante de VH de D2E7 y región codificante de cadena pesada gamma1 constante

10

ES 2 528 892 T3

humana con región codificante transmembrana de Ig gamma1 humana

<400> 7

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1           5           10           15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50           55           60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala
65           70           75           80

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
          85           90           95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp
          115          120          125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130          135          140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145          150          155          160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
          165          170          175

```

5

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

ES 2 528 892 T3

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys Ala Glu Ala Gln
 465 470 475 480

Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr
 485 490 495

Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Thr Val Thr Phe Phe Lys
 500 505 510

Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile Ile
 515 520 525

Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 530 535

<210> 8

<211> 7341

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia para el vector de cadena pesada de anticuerpo gamma-1 humano transponible pIRES-EGFP-T1T2-IgH

<400> 8

ES 2 528 892 T3

gacggatcgg gagatctocc gatcccctat ggtogactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgttaa ccotagaaag	180
atagtctgcg taaaattgac gcatgcattc ttgaaatatt gctctctctt tctaaatagc	240
gogaatccgt cgctgtgcat ttaggacatc tcagtcgccg cttggagctc ccgtgaggcg	300
tgcttgtaa tgcggttaagt gtcactgatt ttgaactata acgaccgct gagtcaaat	360
gacgcatgat tatcttttac gtgactttta agatttaact catacgataa ttatattggt	420
atctcatggt ctacttacgt gataacttat tatatatata tttctctggt atacaattgc	480
atgaagaatc tgcttagggt taggcgtttt gcgctgcttc gcgatgtaag ggccagatat	540
acgcgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt	600
catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga	660
ccgcccaag acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca	720
atagggactt tcattgacg tcaatgggtg gactatttac ggtaaactgc ccaattggca	780
gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg	840

ES 2 528 892 T3

cccgcctggc attatgcccc gtacatgacc ttatgggact ttcctaactg gcagtacatc 900
 tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgogggtttt ggcaagtacat caatgggggt 960
 ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatggggagt 1020
 ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg 1080
 acgcaaatgg gcggtaggog tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tctctggcta 1140
 actagagaac ccaactgctta ctggcttata gaaattaata cgactcacta tagggagacc 1200
 caagcttggg accgagctcg gatcgatatg gagtttgggc tgagctgggt tttccttgtt 1260
 gcgattttag aagggtgcca gtgtgaggtg cagctgggtg agtctggggg aggcttggtg 1320
 cagcccggca ggtccctgag actctcctgt gcggcctctg gattcacctt tgatgattat 1380
 gccatgcaact gggtcgggca agctccaggg aagggcctgg aatgggtctc agctatcaact 1440
 tggaatagtg gtcacataga ctatgcggac tctgtggagg gccgattcac catctccaga 1500
 gacaacgccca agaactccct gtatctgcaa atgaacagtc tgagagctga ggatacggcc 1560
 gtatattact gtgcgaaagt ctctgacctt agcaaccggt cctcccttga ctattggggc 1620
 caaggtaccc tggtcaccgt ctgagcggct tccaccaagg gcccatgggt ctccccctg 1680
 gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcagccc tgggtgcctt ggtcaaggac 1740
 tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac 1800
 accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg 1860
 cctccagca gcttggggc cagacactac atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac 1920
 accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg 1980
 tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtccttc tcttcccccc aaaacccaag 2040
 gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac 2100
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggaccggc tggaggtgca taatgccaa 2160
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgcgc 2220
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 2280
 ccagccccca togagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 2340
 tacaccctgc ccccatcccc ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 2400
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggt agagcaatgg gcagccggag 2460
 aacaactaca agaccagcc tcccgctctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 2520
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2580
 catgaggtct tgcacaacca ctacacacag aagagcctct cctgtctcc ggagctgcaa 2640
 ctggaggaga gctgtgcgga ggcgcaggac ggggagctgg acgggctgtg gacgaccatc 2700
 accatcttca tcacactctt cctgttaagc gtgtgtatca gtgccaccgt caccttcttc 2760

aaggtgaagt ggatcttctc ctcggtggtg gacctgaagc agaccatcat cccgactac 2820
aggaacatga tcggacaggg ggcctaggcg gccgcgtcga cggaaattcag tggatccact 2880
agtaacggcc gccagtgtgc tggaaattaat tcgctgtctg cgagggccag ctggtggggt 2940
gagtactccc totcaaaagc gggcatgact tctgcgctaa gattgtcagt ttccaaaaac 3000
gaggaggatt tgatattcac ctggcccgcg gtgatgcctt tgaggggtggc cgcgtccatc 3060
tggtcagaaa agacaatctt tttgttgtca agcttgaggt gtggcaggct tgagatctgg 3120
ccatacactt gagtgacaat gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtccactccc 3180
aggtccaact gcaggctgag catgcatcta gggcggccaa ttccgcccct ctccctcccc 3240
ccccctaac gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtgctt ttgtctatat 3300
gtgattttcc accatattgc cgtcttttgg caatgtgagg gcccgaaac ctggccctgt 3360
cttcttgacg agcattccta ggggtctttc ccctctcgcc aaaggaatgc aaggtctggt 3420
gaatgtcgtg aaggaagcag ttctctgga agcttcttga agacaaacaa cgtctgtagc 3480
gacccttgc aggcagcga accccccacc tggcgacagg tgccctctgcg gccaaaagcc 3540
acgtgtataa gatacacctg caaaggcggc acaaccccag tgccacgctg tgagtggat 3600
agttgtggaa agagtcaaat ggcctctctc aagcgtatc aacaaggggc tgaaggatgc 3660
ccagaaggta cccattgta tgggatctga tctggggcct cggtgccatc gctttacatg 3720
tgtttagtgc aggttaaaaa aacgtctagg cccccgaac cacggggacg tggttttcct 3780
ttgaaaaaca cgatgataag cttgccacaa cccgggatcc accggctgcc accatggtga 3840
gcaagggcga ggagctgttc accggggtgg tgcccatcct ggtcagagctg gacggcgacg 3900
taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc 3960
tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccgt gccctggccc acctcgtga 4020
ccaccctgac ctacggcgtg cagtgttca gccgctacc caccacatg aagcagcacg 4080
acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg 4140
acgacggcaa ctacaagacc cgcgcagagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc 4200
gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg 4260
agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca 4320
aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact 4380
accagcagaa ccccccatc ggcgaaggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga 4440
gcaccagtc cgcctgagc aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtccctgctgg 4500
agttcgtgac cgcgcgggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag taaagcggcc 4560
ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc ctctagttgc cagccatctg ttgtttgccc 4620
ctccccgtg ccttcttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa 4680
tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtgg 4740

ES 2 528 892 T3

gcaggacagc aagggggagg attggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg 4800
ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctcg aggataaaaag ttttgttact 4860
ttatagaaga aattttgagt ttttgttttt ttttaataaa taaataaaca taaataaatt 4920
gtttggtgaa tttattatta gtatgtaagt gtaaataataa taaaacttaa tatctattca 4980
aattaataaa taaacctcga tatacagacc gataaaacac atgcgtcaat tttacgcatg 5040
attatcttta acgtacgtca caatatgatt atctttctag ggttaactcg agtgcattct 5100
agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct 5160
agctagagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc 5220
acaattccac acaacatacg agcoggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgcctaataga 5280
gtgagctaac tcacattaat tgcggttgcgc tcaactgcccg cttccagtc gggaaacctg 5340
tcgtgccagc tgcattaatg aatogggcaa dgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg 5400
cgctcttccg ctctctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tgcgttcggct gcggcgagcg 5460
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga 5520
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcggttgcg 5580
gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcat 5640
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc 5700
gtgcgctctc ctggtccgac cctgcogctt accggatacc tgtccgctt tctccctcg 5760
ggaagcgtgg cgctttctca atgctcagc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt 5820
cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc 5880
ggtaactatc gtcttgagtc caaccoggta agacaagact tatcgccact ggcagcagcc 5940
actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggg ctacagagtt cttgaagtgg 6000
tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca 6060
gttaccttcc gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgcgtgtagc 6120
ggtaggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgagaa aaaaaggatc tcaagaagat 6180
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt 6240
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt 6300
tttaaataca tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc 6360
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc 6420
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata 6480
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaccagcc agccggaagg 6540
gccgagcgca gaagtggtec tgcaacttta tccgcctcca tccagttat taattgttgc 6600
cgggaagcta gagtaagtag ttccgagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 6660

ES 2 528 892 T3

acaggcatcg tgggtgcaag ctcgctgctt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa 6720
 cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctocctcggt 6780
 cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca 6840
 ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac 6900
 tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgcaccga gttgctcttg cccggcgctca 6960
 atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 7020
 tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctggtga gatocagttc gatgtaaccc 7080
 actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca 7140
 aaaaaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgata 7200
 ctcatactct tcttttttca atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc 7260
 ggatacatat ttgaatgtat ttgaaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 7320
 cgaaaagtgc cacctgacgt c 7341

5 <210> 9
 <211> 437
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Biblioteca de ADN que codifica dominios de cadena pesada variable que contiene secuencias N en la HCDR3 y flanqueados por sitios de restricción ClaI y Eco47III con 4 nucleótidos adicionales en los extremos 5' y 3' para facilitar la digestión con enzimas de restricción.

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (362)..(385)
 <223> N = comodín, el nucleótido puede ser cualquiera de los cuatro nucleótidos que aparecen en el ADN
 <400> 9

aattatcgat atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgagatt tagaagggtg 60
 ccagtgtgag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcccg gcaggtcctt 120
 gagactctcc tgtgaggcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg 180
 gcaagctcca gggaagggcc tggaatgggt ctgagctatc acttggaata gtggtcacat 240
 agactatgag gactctgtgg agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc 300
 cctgtatctg caaatgaaca gtctgagagc tgaggatagc gccgtatatt actgtgcgaa 360
 annnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntccct tgactattgg ggccaaggta ccctggctac 420
 cgtctcgagc gctgcat 437

25 <210> 10
 <211> 395
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 528 892 T3

<220>

<223> Biblioteca de ADN que codifica dominios de cadena ligera variable que contienen secuencias N en la LCDR3 y flanqueados por sitios de restricción ClaI y Eco47III, con 4 nucleótidos adicionales en los extremos 5' y 3' para facilitar la digestión con enzimas de restricción

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (337)..(351)

<223> N = comodín, el nucleótido puede ser cualquiera de los cuatro nucleótidos que aparecen en el ADN

10

<400> 10

```
atggacatga gggccctgc tcagctcctg ggaactcctgc tgctctggct cccaggtgcc      60
agatgtgaca tccagatgac ccagctcca tccctccctgt ctgcatctgt aggggacaga      120
gtcaccatca cttgtcgggc aagtcagggc atcagaaatt acttagcctg gtatcagcaa      180
aaaccagga aagcccctaa gctcctgatc tatgctgcat ccactttgca atcaggggtc      240
ccatctcggg tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagccta      300
cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaggnnnn nnnnnnnnnn ntatactttt      360
ggccagggga ccaaggtgga aatcaagcgc tgcatt                                     395
```

15

<210> 11

<211> 1784

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ORF de enzima transposasa PiggyBac funcional

<400> 11

ES 2 528 892 T3

atgggtagtt ctttagacga tgagcatatc ctctctgctc ttctgcaaag cgatgacgag 60
 cttgttggtg aggattctga cagtgaata tcagatcacg taagtgaaga tgacgtccag 120
 agcgatacag aagaagcgtt tatagatgag gtacatgaag tgcagccaac gtcaagcgg 180
 agtgaaatat tagacgaaca aatgttatt gaacaaccag gttcttcatt ggcttctaac 240
 agaatcttga ccttgccaca gaggactatt agaggtaaga ataaacattg ttggtcaact 300
 tcaaagtcca cgaggcgtag ccgagtctct gcaactgaaca ttgtcagatc tcaaagaggt 360
 ccgacgcgta tgtgccgcaa tatatatgac ccacttttat gcttcaaact attttttact 420
 gatgagataa tttcggaaat tgtaaaatgg acaaatgctg agatatcatt gaaacgtcgg 480
 gaatctatga caggtgctac atttcgtgac acgaatgaag atgaaatcta tgctttcttt 540
 ggtattctgg taatgacagc agtgagaaaa gataaccaca tgtccacaga tgacctcttt 600
 gatcgatctt tgtcaatggt gtacgtctct gtaatgagtc gtgatcgttt tgattttttg 660
 atacgatgtc ttagaatgga tgacaaaagt atacggccca cacttcgaga aaacgatgta 720
 tttactcctg ttagaaaaat atgggatctc tttatccatc agtgcataca aaattacact 780

 ccaggggctc atttgaccat agatgaacag ttacttggtt ttagaggacg gtgtccgttt 840
 aggatgtata tcccaaaca gccaaagtaag tatggaataa aaatcctcat gatgtgtgac 900
 agtggtacga agtatatgat aaatggaatg ccttattttg gaagaggaac acagaccaac 960
 ggagtaccac tcggtgaata ctacgtgaag gagttatcaa agcctgtgca cggtagttgt 1020
 cgtaatatta cgtgtgacaa ttggttcacc tcaatccctt tggcaaaaaa ctactacaa 1080
 gaaccgtata agttaaccat tgtgggaacc gtgogatcaa acaaacgoga gataccggaa 1140
 gtactgaaaa acagtcgctc caggccagtg ggaacatcga tgttttgttt tgacggaccc 1200
 ctactctcg tctcatataa accgaagcca gctaagatgg tatacttatt atcatcttgt 1260
 gatgaggatg cttctatcaa cgaaagtacc ggtaaaccgc aaatggttat gtattataat 1320
 caaactaaag gcggagtgga cacgctagac caaatgtggt ctgtgatgac ctgcagtagg 1380
 aagacgaata ggtggcctat ggcattattg tacggaatga taaacattgc ctgcataaat 1440
 tcttttatta tatacagcca taatgtcagt agcaagggag aaaaggttca aagtcgcaaa 1500
 aaatttatga gaaacctta catgagcctg acgtcatcgt ttatgcgtaa gcgttagaa 1560
 gctcctactt tgaagagata tttgcgcgat aatatctcta atattttgcc aatgaagtg 1620
 cctggtacat cagatgacag tactgaagag ccagtaatga aaaaacgtac ttactgtact 1680
 tactgcccct ctaaaataag gogaaaggca aatgcacgtg gcaaaaaatg caaaaaagtt 1740
 atttgtcgag agcataatat tgatatgtgc caaagttggt ttag 1784

ES 2 528 892 T3

<210> 12
<211> 593
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia proteica de enzima transposasa PiggyBac

10

<400> 12

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80

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

ES 2 528 892 T3

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
 340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
 355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
 370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
 385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
 405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
 420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
 435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
 450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
 465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
 485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
 500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
 515 520 525

Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
 530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590

Cys

5 <210> 13
 <211> 7385
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de la construcción de expresión de PiggyBac pCDNA3.1-hygro(+)-PB
 <400> 13

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gagctcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttaagggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 togctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacocca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggog 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 900
 gtttaaactt aagcttggtg ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc 960
 agatatgggt agttctttag acgatgagca tctctctct gctcttctgc aaagcgatga 1020
 cgagcttggt ggtgaggatt ctgacagtga aatatcagat cacgtaagtg aagatgacgt 1080
 ccagagcgat acagaagaag cgtttataga tgaggtacat gaagtgcagc caacgtcaag 1140
 cggtagtgaa atattagacg aacaaaatgt tattgaacaa ccaggttctt cattggcttc 1200
 taacagaatc ttgacctgc cacagaggac tattagaggt aagaataaac attgttggtc 1260
 aacttcaaag tccacgaggc gtagccgagt ctctgcactg aacattgtca gatctcaaag 1320
 aggtccgacg cgtatgtgcc gcaatatata tgaccactt ttatgcttca aactatTTTT 1380
 tactgatgag ataatttcgg aaattgtaa atggacaaat gctgagatat cattgaaacg 1440
 tcgggaatct atgacaggtg ctacatttog tgacacgaat gaagatgaaa tctatgcttt 1500
 ctttgggtatt ctggtaatga cagcagtgag aaaagataac cacatgtcca cagatgacct 1560

ES 2 528 892 T3

ctttgatcga tctttgtcaa tgggtgacgt ctctgtaatg agtcgtgatc gttttgattt 1620
 tttgatacga tgtcttagaa tggatgacaa aagtatacgg cccacacttc gagaaaacga 1680
 tgtatttact cctgttagaa aaatatggga tctctttatc catcagtgca tacaaaatta 1740
 cactccaggy gctcatttga ccatagatga acagttactt ggttttagag gacgggtgtcc 1800
 gtttaggatg tatatcccaa acaagccaag taagtatgga ataaaaatcc tcatgatgtg 1860
 tgacagtggc acgaagtata tgataaatgg aatgcottat ttgggaagag gaacacagac 1920
 caacggagta ccaactcggc aatactacgt gaaggagtta tcaaagcctg tgcaacggtag 1980
 ttgtcgtaat attacgtgtg acaattgggt cacctcaatc cctttggcaa aaaacttact 2040
 acaagaaccg tataagttaa ccattgtggg aaccgtgcga tcaaacaac gcgagatacc 2100
 ggaagtactg aaaaacagtc gctccagggc agtgggaaca tcgatgtttt gttttgacgg 2160
 accccttact ctcgtctcat ataaaccgaa gccagctaag atggtatact tattatcatc 2220
 ttgtgatgag gatgcttcta tcaacgaaag taccggtaa cgcgcaatgg ttatgtatta 2280
 taatcaaact aaaggcggag tggacaogct agaccaaatg tgttctgtga tgacctgcag 2340
 taggaagacg aataggtggc ctatggcatt attgtacgga atgataaaca ttgcctgcat 2400
 aaattctttt attatataca gccataatgt cagtagcaag ggagaaaagg ttcaaagtgc 2460
 caaaaaattt atgagaaacc tttacatgag cctgacgtca tcgtttatgc gtaagcgttt 2520
 agaagctcct actttgaaga gatatttgcg cgataatata tctaataatt tgccaaatga 2580
 agtgccctgt acatcagatg acagtactga agagccagta atgaaaaaac gtacttactg 2640
 tacttactgc ccctctaaaa taaggcgaaa ggcaaatgca tcgtgcaaaa aatgcaaaaa 2700
 agttatttgt cgagagcata atattgatat gtgccaaagt tgttttagat ccagcacagt 2760
 gggggccgct cgagtctaga gggcccgttt aaaccgcctg atcagcctcg actgtgcctt 2820
 ctagttgcca gccatctgtt gtttgcccct ccccctgccc ttccttgacc ctggaagggtg 2880
 ccactcccac tgtcctttcc taataaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt 2940
 gtcattctat tctggggggg ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca 3000
 atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct 3060
 ggggctctag ggggtatccc cacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gggggtgtgg 3120
 tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgccct cctttcgctt 3180
 tcttccttc ctttctcgcc acgttgcgag gctttcccag tcaagctcta aatcggggca 3240
 tcccttagg gttcogattt agtgctttac ggcacctoga ccccaaaaaa cttgattagg 3300
 gtgatggctc acgtagtggg ccatcgccct gatagcggg ttttcgccct ttgaogttgg 3360
 agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 3420
 cggctctattc ttttgattta taagggattt tggggatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 3480

ES 2 528 892 T3

agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg 3540
 tggaaagtcc ccaggctccc caggcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt 3600
 cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc 3660
 atctcaatta gtcagcaacc atagtccgc ccctaactcc gccatcccg cccctaactc 3720
 cgcccagttc cgcccattct ccgcccctg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg 3780
 ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc agaagtatg aggaggcttt tttggaggcc 3840
 taggcctttg caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct gatcagcacg 3900
 tgatgaaaaa gcctgaactc accgcgacgt ctgtcgagaa gtttctgac gaaaagtctg 3960
 acagcgtctc cgacctgatg cagctctcgg agggcgaaga atctcgtgct ttcagcttcg 4020
 atgtaggagg gcgtggatat gtctgcggg taaatagctg cgccgatggt ttctacaaag 4080
 atcgttatgt ttatcggcac tttgcatcgg ccgcgctccc gattccggaa gtgcttgaca 4140
 ttggggaatt cagcgagagc ctgacctatt gcatctccc cgtgcacag ggtgtcacgt 4200
 tgcaagacct gcctgaaacc gaactgccg ctgttctgca gccggtcgcg gaggccatgg 4260
 atgcgatcgc tgcggccgat cttagccaga cgagcgggtt cggcccattc ggaccgcaag 4320
 gaatcggtea atacactaca tggcgtgatt tcatatgcgc gattgctgat ccccatgtgt 4380
 atcactggca aactgtgatg gacgacaccg tcaagtgcgc cgtcgcgcag gctctcgatg 4440
 agctgatgct ttgggcccag gactgcccg aagtcoggca cctcgtgcac gcggatttcg 4500
 gctccaacaa tgtcctgacg gacaatggcc gcataacagc ggtcattgac tggagcaggg 4560
 cgatgttcgg ggattcccaa tacgaggtcg ccaacatctt cttctggagg ccgtggttgg 4620
 cttgtatgga gcagcagacg cgctacttcg agcggaggca tccggagctt gcaggatcgc 4680
 cgcggtccg ggcgtatatg ctccgcattg gtcttgacca actctatcag agcttggttg 4740
 acggcaattt cgatgatgca gcttgggcgc agggctgatg cgacgcaatc gtccgatccg 4800
 gagccgggac tgtcgggcgt acacaaatcg ccgcgagaag cgcggccgtc tggaccgatg 4860
 gctgtgtaga agtactgcc gatagtggaa accgacgcc cagcactcgt ccgagggcaa 4920
 aggaatagca cgtgctacga gatttcgatt ccaccgccg cttctatgaa aggttgggct 4980
 tcggaatcgt tttccgggac gccggtgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg 5040
 agttcttgc ccacccaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 5100
 gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcaactgca ttctagttgt ggtttgtcca 5160
 aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac ctctagctag agcttggcgt 5220
 aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca 5280
 taogagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat 5340
 taattgcggt gcgctcactg cccgcttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt 5400

aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttcc 5460
cgctcaactga ctcgctgcgc tcggtcgctc ggctgoggcg agcggatca gctcaactca 5520
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa 5580
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgctt tccatagge 5640
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca 5700
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgctgcgc tctcctgttc 5760
cgaccctgcc gottaccgga tacctgtcog cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 5820
ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 5880
gtgtgcacga acccccogtt cagcccagacc gctgogcctt atccggtaac tatcgtcttg 5940
agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 6000
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 6060
aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 6120
gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt ttttttgttt 6180
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta 6240
cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgtaagg gattttgctc atgagattat 6300
caaaaaggat ctacacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa 6360
gtatatatga gtaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct 6420
cagcgatctg tetatctcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta 6480
cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct 6540
caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgcagaagtg 6600
gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccggga gctagagtaa 6660
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaac ttggtgcat tgctacaggc atcgtggtgt 6720
cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggctc ccaacgatca aggcgagtta 6780
catgatcccc catgttgctc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcc atcgttgctc 6840
gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctotta 6900
ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 6960
gagaatagtg tatgcccgca ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg 7020

ogccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaaac 7080
tctcaaggat ctaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact 7140
gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa 7200
atgccgcaa aaagggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttccttt 7260
ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtotcat gagcggatac atatttgaat 7320

ES 2 528 892 T3

	gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg	7380
	acgtc	7385
5	<210> 14 <211> 246 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de ITR de Sleeping Beauty cadena arriba con secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción MunI flanqueantes y 4 nucleótidos en los extremos 5' y 3' para facilitar la digestión con enzimas de restricción	
	<400> 14	
	atatcaattg agttgaagtc ggaagtttac atacacttaa gttggagtca ttaaaactcg	60
	tttttcaact acaccacaaa tttcttgta acaacaata gttttggcaa gtcagttagg	120
	acatctactt tgtgcatgac acaagtcatt tttccaaca ttgtttacag acagattatt	180
	tcacttataa ttcactgtat cacaattcca gtgggtcaga agtttacata cactaacaat	240
15	tgatat	246
20	<210> 15 <211> 248 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencia de ITR de Sleeping Beauty cadena abajo con secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI flanqueantes y 4 nucleótidos en los extremos 5' y 3' para facilitar la digestión con enzimas de restricción	
	<400> 15	
	atatctcgag ttgagtgtat gtttaacttct gacccactgg gaatgtgatg aaagaaataa	60
	aagctgaaat gaatcattct ctctactatt attctgatat ttcacattct taaaataaag	120
	tggtgatcct aactgacctt aagacagga atctttactc ggattaaatg tcaggaattg	180
	tgaaaaagtg agtttaaatg tatttggcta aggtgtatgt aaacttcoga cttcaactct	240
30	cgagatat	248
35	<210> 16 <211> 6339 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia del vector de expresión de LC kappa Ig humana de pIRES-EGFP-sbT1T2-IgL	
	<400> 16	

ES 2 528 892 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgtc gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgagtt gaagtcggaa 180

ES 2 528 892 T3

gtttacatac acttaagttg gagtcattaa aactcgtttt tcaactacac cacaaatttc 240
 ttgttaacaa acaatagttt tggcaagtca gttaggacat ctactttgtg catgacacaa 300
 gtcatttttc caacaattgt ttacagacag attatttcac ttataattca ctgtatcaca 360
 attccagtgg gtcagaagtt tacatacact aacaattgca tgaagaatct gcttaggggt 420
 aggcgttttg cgctgcttcg cgatgtacgg gccagatata cgcggtgaca ttgattattg 480
 actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc 540
 cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 600
 ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt 660
 caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 720
 ccaagtaocg cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag 780
 tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 840
 accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatggcggtg gatagcgggt tgactcacgg 900
 ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttgga ccaaaatcaa 960
 cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt 1020
 gtacggtggg aggtctatat aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac 1080
 tggcttatcg aaattaatac gactcactat agggagacc aagcttggtg ccgagctcgg 1140
 atcgatatgg acatgagggt ccctgctcag ctccctgggac tccctgctgct ctggctccca 1200
 ggtgccagat gtgacatcca gatgaccag tetccatcct ccctgtctgc atctgtaggg 1260
 gacagagtca ccatcacttg tcgggcaagt cagggcatca gaaattactt agcctggtat 1320
 cagcaaaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctatg ctgcatccac tttgcaatca 1380
 ggggtcccat ctcggttcag tggcagtgga tctgggacag atttactct caccatcagc 1440
 agcctacagc ctgaagatgt tgcaacttat tactgtcaaa ggtataaccg tgcaccgtat 1500
 acttttgcc aggggaccaa ggtggaatc aagcgtctg tggctgcacc atctgtcttc 1560
 atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 1620
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 1680
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 1740
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 1800
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaaatc 1860
 tgcggccgag tcgacggaat tcagtggatc cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat 1920
 taattcgctg tctgcgaggg ccagctggtg gggtagtac tccctctcaa aagcgggcat 1980
 gacttctgag ctaagattgt cagtttccaa aaacgaggag gatttgatat tcacctggcc 2040
 cgcggtgatg cctttgaggg tggcgcgctc catctggtca gaaaagacaa tctttttgtt 2100
 gtcaagcttg aggtgtggca ggcttgagat ctggccatac acttgagtga caatgacatc 2160

cactttgcct ttctctccac aggtgtccac tcccaggtcc aactgcaggt cgagcatgca 2220
 tctagggcgg ccaattccgc ccctctccct ccccccccc taacgttact ggccgaagcc 2280
 gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgtgatt ttccaccata ttgccgtctt 2340
 ttggcaatgt gagggccccg aaacctggcc ctgtcttctt gacgagcatt cctaggggtc 2400
 ttccccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa gcagttcctc 2460
 tggaaagctc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct ttgcaggcag cggaaacccc 2520
 cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg 2580
 cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt ggaagagtc aatggctct 2640
 cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtaccccat tgtatgggat 2700
 ctgatctggg gcctcgggtc acatgcttta catgtgttta gtcgaggta aaaaaacgtc 2760
 taggcccccc gaaccaoggg gacgtggtt tctttgaaa aacacgatga taagcttgcc 2820
 acaaccggg atccaccggt cggccaccat gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg 2880
 gtggtgccca tcttggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc 2940
 ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgacc tgaagttcat ctgcaccacc 3000
 ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacc tgacctacgg cgtgcagtgc 3060
 ttcagccgct accccgacca catgaagcag cacgacttct tcaagtccgc catgcccgaa 3120
 ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgccc 3180
 gaggtgaagt tcgagggcga caccctgggt aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc 3240
 aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc 3300
 tataatcatg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac 3360
 atcgaggacg gcagcgtgca gctcgcgcac cactaccagc agaacacccc catcgggcgc 3420
 ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac ctgagcacc agtcogccct gagcaaagac 3480
 cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact 3540
 ctcgcatggt acgagctgta caagtaaagc ggccctagag ctogctgac agcctcgact 3600
 gtgcctctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg 3660
 aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 3720
 gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 3780
 aagacaatag caggcatgct ggggatgccc tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa 3840
 ccagctgggg ctogagttga gtgtatgtta acttctgacc cactgggaat gtgatgaaag 3900
 aaataaaagc tgaatgaat cattctctct actattatc tgatatttca cattcttaa 3960
 ataaagtggg gatcctaact gaccttaaga caggaatct ttactcggat taaatgtcag 4020
 gaattgtgaa aaagtgagtt taaatgtatt tggctaaggt gtatgtaaac ttccgacttc 4080

aactctogag tgcattctag ttgtggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc 4140
tgtataccgt cgacctctag ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg 4200
tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa 4260
gocctgggtg octaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtc 4320
ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa toggccaacg cgcggggaga 4380
ggcggtttgc gtattgggcg ctcttcogct tcctcgtca ctgactcgtc gcgctcggtc 4440
gttcggctgc ggcgagcgt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 4500
tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 4560
aaaaaggcgg cgttgctggc gtttttccat aggctcggcc cccctgacga gcacacaaa 4620
aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 4680
ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc cgcgcttac cggataacctg 4740
tccgcctttc tcccttggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc 4800
agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 4860
gaccgctcgg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta 4920
tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 4980
acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc 5040
tgcgctctgc tgaagccagt taccttogga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 5100
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 5160
aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 5220
aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 5280
ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 5340
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 5400
atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 5460
cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcacggg ctocagattt atcagcaata 5520
aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctcctg caactttatc cgcctccatc 5580
cagtcatta attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgcagttaa tagtttgccg 5640
aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 5700
ttcagctccg gttcccaacg atcaaggoga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa 5760
ggcgttagct ccttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 5820
ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatcgt aagatgcttt 5880
tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 5940
tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgcac atagcagaac tttaaaagtg 6000
ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggoga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga 6060

ES 2 528 892 T3

tccagttcga tgaacccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 6120
 agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaag caaaatgccg caaaaaagg aataagggcg 6180
 acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 6240
 ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 6300
 gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgaagtc 6339

5 <210> 17
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fase abierta de lectura (ORF) de la enzima transposasa Sleeping Beauty
 <400> 17

atgggaaaat caaaagaaat cagccaagac ctcagaaaaa aaattgtaga cctccacaag 60
 tctggttcat ccttgggagc aatttccaaa cgccctgaaag taccacgttc atctgtacaa 120
 acaatagtac gcaagtataa acaccatggg accacgcagc cgtcataccg ctcaggaagg 180
 agacgcgttc tgtctcctag agatgaacgt actttggtgc gaaaagtgc aatcaatccc 240
 agaacaacag caaaggacct tgtgaagatg ctggaggaaa caggtacaaa agtatctata 300
 tccacagtaa aacgagtcct atatcgacat aacctgaaag gccgctcagc aaggaagaag 360
 ccactgctcc aaaaccgaca taagaaagcc agactacggt ttgcaactgc acatggggac 420
 aaagatcgta ctttttggag aatgtcctc tggctgatg aaacaaaaat agaactgttt 480
 ggccataatg accatcgta tgtttggagg aagaaggggg aggcttgcaa gccgaagaac 540
 accatcccaa ccgtgaagca cgggggtggc agcatcatgt tgtgggggtg ctttgctgca 600
 ggagggactg gtgcacttca caaaatagat ggcatcatga ggaaggaaaa ttatgtggat 660
 atattgaagc aacatctcaa gacatcagtc aggaagttaa agcttggtcg caaatgggtc 720
 ttccaaatgg acaatgacct caagcatact tccaaagttg tggcaaaatg gcttaaggac 780
 aacaaagtca aggtattgga gtggccatca caaagccctg acctcaatcc tatagaaaat 840
 ttgtgggcag aactgaaaa gcgtgtcga gcaaggaggc ctacaaacct gactcagta 900
 caccagctct gtcaggagga atgggcaaaa attcaccocaa cttattgtgg gaagcttgtg 960
 gaaggctacc cgaaacgttt gaccocagtt aaacaattta aaggcaatgc taccaatac 1020
 tag 1023

15 <210> 18
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia proteica de la enzima transposasa Sleeping Beauty

<400> 18

Met Gly Lys Ser Lys Glu Ile Ser Gln Asp Leu Arg Lys Lys Ile Val
 1 5 10 15

Asp Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Leu Gly Ala Ile Ser Lys Arg Leu
 20 25 30

Lys Val Pro Arg Ser Ser Val Gln Thr Ile Val Arg Lys Tyr Lys His
 35 40 45

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
 85 90 95

Lys Val Ser Ile Ser Thr Val Lys Arg Val Leu Tyr Arg His Asn Leu
 100 105 110

Lys Gly Arg Ser Ala Arg Lys Lys Pro Leu Leu Gln Asn Arg His Lys
 115 120 125

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
 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

Ile Asp Gly Ile Met Arg Lys Glu Asn Tyr Val Asp Ile Leu Lys Gln
 210 215 220

His Leu Lys Thr Ser Val Arg Lys Leu Lys Leu Gly Arg Lys Trp Val
 225 230 235 240

Phe Gln Met Asp Asn Asp Pro Lys His Thr Ser Lys Val Val Ala Lys

ES 2 528 892 T3

ctgcttactg gottatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctagc 900
 gtttaaactt aagcttggtg cagagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc 960
 agatatggga aatcaaaaag aatcagcca agacctcaga aaaaaattg tagacctcca 1020
 caagtctggt tcacacctgg gagcaatttc caaacgcctg aaagtaccac gttcatctgt 1080
 acaacaata gtacgcaagt ataaacacca tgggaccacg cagccgtcat accgctcagg 1140
 aaggagacgc gttctgtctc cttagatga acgtactttg gtgcgaaaag tgcaaatcaa 1200
 tcccagaaca acagcaaagg accttgtgaa gatgctggag gaaacaggta caaaagtatc 1260
 tatatccaca gtaaaacgag tctatatacg acataacctg aaaggccgtc cagcaaggaa 1320
 gaagccactg ctccaaaacc gacataaga agccagacta cggtttgcaa ctgcacatgg 1380
 ggacaaagat cgtacttttt ggagaaatgt cctctggtct gatgaaaca aatagaact 1440
 gtttggccat aatgaccatc gttatgtttg gaggaagaag ggggaggctt gcaagccgaa 1500
 gaacaccatc ccaaccgtga agcacggggg tggcagcatc atgttgtggg ggtgctttgc 1560
 tgcaggaggg actggtgcac ttcacaaaat agatggcatc atgaggaagg aaaattatgt 1620
 ggatatattg aagcaacatc tcaagacatc agtcaggaag ttaaagcttg gtcgcaaatg 1680
 ggtcttccaa atggacaatg accccaagca tacttccaa gttgtggcaa aatggcttaa 1740
 ggacaacaaa gtcaaggtat tggagtggcc atcacaagc cctgacctca atcctataga 1800
 aaatttgtgg gcagaactga aaaagcgtgt gcgagcaagg aggcctacaa acctgactca 1860
 gttacaccag ctctgtcagg aggaatgggc caaaattcac ccaacttatt gtgggaagct 1920
 tgtggaaggc taccgaaac gtttgacca agttaaaca ttaaaaggca atgctaccaa 1980
 atactagatc cagcacagtg gcggccgctc gagtctagag ggcccgttta aaccgctga 2040

 tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctggtt tttgcccctc ccccgctgct 2100
 tccttgacc cggaggtgc cactccact gtccttctct aataaaatga ggaattgca 2160
 tcgcatgtc tgagttagtg tcattctatt ctggggggtg ggggaggca ggacagcaag 2220
 ggggaggatt ggaagacaa tagcaggcat gctgggatg cgggaggctc tatggcttct 2280
 gaggcgaaa gaaccagctg gggetctagg gggtatccc acgocccctg tagcggcgca 2340
 ttaagcgcg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgacc ctacacttgc cagcgccta 2400
 gcgcccgtc ctttgcctt cttcccttc tttctgcga cgttcgccc ctttcccgt 2460
 caagctctaa atcggggcat cccttaggg ttccgattta gtgctttac gcacctcgac 2520
 ccaaaaaaac ttgattagg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt 2580
 tttgcacct tgacgttga gtccacgttc ttaaatagt gactcttgtt ccaaactgga 2640
 acaactca accctatctc ggtctattct tttgattat aagggatttt ggggatttgc 2700
 gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaatta attctgtgga 2760

ES 2 528 892 T3

atgtgtgtca gttaggggtg ggaaagtccc caggctcccc aggcaggcag aagtatgcaa 2820
 agcatgcate tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 2880
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg 2940
 cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt 3000
 ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga 3060
 ggaggctttt ttggaggcct aggccttttg aaaaagctcc cgggagcttg tatatccatt 3120
 ttcggatctg atcagcacgt gatgaaaaag cctgaactca ccgcgacgtc tgtcgagaag 3180
 tttctgatcg aaaagttcga cagcgtctcc gacctgatgc agctctcggg gggcgaagaa 3240
 tctcgtgctt tcagcttoga tgtaggaggg cgtggatatg tcctgcgggt aatagctgc 3300
 gccgatggtt tctacaaaga tcgttatggt tatcggcaact ttgcatcggc cgcgctcccg 3360
 attccggaag tgcttgacat tggggaatte agcagagacc tgacctattg catctcccgc 3420
 cgtgcacagg gtgtcacgtt gcaagacctg cctgaaaccg aactgcccgc tgttctgcag 3480
 ccggtcgcgg aggccatgga tgcgatcgtc gcggccgatc ttagccagac gagcgggttc 3540
 ggccattcog gaccgcaagg aatcggtaa tacactacat ggcgatgatt catatgcgcg 3600
 attgctgatc cccatgtgta tcaactggcaa actgtgatgg acgacaccgt cagtgcgtcc 3660
 gtcgcgcagg ctctcgatga gctgatgctt tggccgagg actgccccga agtccggcac 3720
 ctcgtgcaag cggatttcgg ctccaacaat gtcctgacgg acaatggccg cataacagcg 3780
 gtcattgact ggagcgaggc gatgttcggg gattcccaat acgaggtcgc caacatcttc 3840
 ttctggaggc cgtggttggc ttgtatggag cagcagacgc gctacttoga ggggagcat 3900
 ccggagcttg caggatcgcg gcggctccgg gcgtatatgc tccgcattgg tcttgaccaa 3960
 ctctatcaga gcttgggtga cggcaatttc gatgatgcag cttgggcgca gggctgatgc 4020
 gacgcaatcg tccgatccgg agccgggact gtcgggcgta cacaaatcgc ccgcagaagc 4080
 gcggccgtct ggaccgatgg ctgtgtagaa gtactcgcg atagtggaaa ccgacgcccc 4140
 agcactcgtc cgagggcaaa ggaatagcac gtgctacgag atttcgattc caccgcccgc 4200
 ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag 4260
 cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc agcttataat 4320
 ggttcaaat aaagcaatag catcacaat ttcaacaata aagcattttt tcaactgcat 4380
 tctagttgtg gtttgccaa actcatcaat gtatcttacc atgtctgtat accgtcgacc 4440
 tctagctaga gcttggcgta atcatggtca tagctgttcc ctgtgtgaaa ttgttatccg 4500
 ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa 4560
 tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca gtcgggaaac 4620
 ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt 4680
 gggcgtctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct ccgctcgttcg gctgcggcga 4740

ES 2 528 892 T3

gcggtatcag ctcaactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 4800
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg 4860
 ctggcggtttt tccataggct ccgccccct gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt 4920
 cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggagctcc 4980
 ctcgtgcgct ctctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccc cttctccct 5040
 tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 5100
 gtctgcctca agctgggctg tgtgcaagaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 5160
 tccggttaact atcgtcttga gtccaaccocg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 5220
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtagggc gtgctacaga gttcttgaag 5280
 tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag 5340
 ccagttacct tcggaaaaag agttgtagc tottgatccg gcaaaaaac caccgctggg 5400
 agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa 5460
 gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgtaaggg 5520
 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa ttaaaaatga 5580
 agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta 5640
 atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgccctgactc 5700
 cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 5760
 atacogcgag acccagctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 5820
 agggcogagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgctt ccatccagtc tattaattgt 5880

 tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 5940
 gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc 6000
 caacgatcaa ggogagttac atgatcccc atggtgtgca aaaaagcggg tagctccttc 6060
 ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcaggtt tatcaactcat ggttatggca 6120
 gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tcogtaagat gcttttctgt gactggtgag 6180
 tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgccggcg 6240
 tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa 6300
 cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 6360
 cccactcgtg caoccaactg atcttcagca tottttactt tcaccagcgt ttctgggtga 6420
 gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggataa gggcgacacg gaaatggtga 6480
 atactcatic tottctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 6540
 agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc ggcacattt 6600
 cccgaaaag tgccacctga cgtc 6624

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad deseada, que comprende:

- 5 (i) generar una colección diversa de polinucleótidos, preferentemente vectores plasmídicos o amplicones de PCR, de ADN bicatenario, que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, en donde dichos polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un polipéptido dispuesto entre una primera y una segunda secuencias de repeticiones terminales invertidas que son reconocidas por al menos una enzima transposasa y son funcionales con ella;
- 10 (ii) introducir la colección diversa de polinucleótidos de (i) en las células hospedadoras;
- (iii) expresar en la células hospedadoras al menos una enzima transposasa funcional con dichas secuencias de repeticiones terminales invertidas, de modo que dicha colección diversa de polinucleótidos se integre en el genoma de la célula hospedadora para proporcionar una población de células hospedadoras que exprese dicha colección diversa de polinucleótidos que codifican polipéptidos que presentan diferentes especificidades de unión y funcionalidades;
- 15 (iv) explorar dichas células hospedadoras para identificar una célula hospedadora que expresa un polipéptido con una especificidad de unión o funcionalidad deseada; y
- (v) aislar la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de dicha célula hospedadora.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos polinucleótidos comprenden

- a) una secuencia de unión a ligando de un receptor o una secuencia de unión a diana de una molécula de unión,
- 25 b) una secuencia de unión a antígeno de un anticuerpo,
- c) una secuencia que codifica una región VH o VL de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
- d) una secuencia que codifica una región VH de un anticuerpo y una región VL de un anticuerpo,
- e) una secuencia que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y/o
- 30 f) una secuencia que codifica un dominio Fv monocatenario o uno Fab.

3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones mencionadas, en el que la generación de dicha colección diversa de polinucleótidos comprende someter secuencias génicas de región V a PCR en condiciones de mutación.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones mencionadas, en el que la etapa (ii) comprende introducir en dichas células hospedadoras polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican

- a) regiones VH o VL de inmunoglobulina, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, y en el que dichas secuencias de región VH y VL se codifican en vectores separados y/o
- 40 b) cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulina de longitud completa, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, en donde dichas secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa están en vectores separados,
- c) un vector que comprende secuencias que codifican cadenas VH y VL de anticuerpo.
- 45 d) un vector que comprende secuencias que codifican una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa y una cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones mencionadas, en el que dicha etapa de expresión (iii) comprende introducir en dichas células hospedadoras un vector de expresión que codifica una enzima transposasa que reconoce y es funcional con dichas secuencias de repeticiones terminales invertidas, en donde dicha enzima transposasa se expresa preferentemente de forma transitoria en dicha célula hospedadora.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones mencionadas, en el que dicha etapa de exploración (iv) comprende separación de células activadas magnéticamente (MACS), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), selección frente a moléculas inmovilizadas en una superficie sólida, selección con respecto a unión con moléculas asociadas a membrana celular incorporadas en una membrana de bicapa lipídica celular, natural o artificialmente reconstituida, o exploración de alto rendimiento de clones celulares individuales en formato multi-pocillo con respecto a un fenotipo funcional o de unión deseado.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones mencionadas, en el que dicha etapa (v) de aislar la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad deseada comprende amplificación genómica o por RT-PCR o secuenciación profunda de siguiente generación.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones mencionadas, en el que

65

a) dichas secuencias de repeticiones terminales invertidas son del sistema de transposón PiggyBac o del sistema de transposón Sleeping Beauty y/o

b) la etapa (iii) comprende introducir en dicha célula hospedadora un vector que comprende una secuencia que codifica una transposasa PiggyBac o transposasa Sleeping Beauty funcionales.

5 9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones mencionadas, en el que dichas secuencias de repeticiones terminales invertidas se reconocen por y son funcionales con al menos una transposasa seleccionada del grupo que consiste en: PiggyBac, Sleeping Beauty, Frog Prince, Himar1, Passport, Minos, hAT, Tol1, Tol2, Ac/Ds, PIF, Harbinger, Harbinger3-DR y Hsmar1.

10 10. Una biblioteca de moléculas polinucleotídicas que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, que comprende una pluralidad de moléculas polinucleotídicas, preferentemente plásmidos o amplicones de PCR de ADN bicatenario, en donde dichas moléculas polinucleotídicas comprenden una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que son reconocidas por al menos una enzima transposasa y son funcionales con ella.

11. Una biblioteca de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dichos polinucleótidos comprenden

20 a) al menos una secuencia que codifica una secuencia de unión a antígeno de un anticuerpo,
b) una secuencia que codifica una región VH o VL de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo,

c) una secuencia que codifica una región VH de anticuerpo y una región VL de anticuerpo,

25 d) una secuencia que codifica una cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa, o un fragmento de unión a antígeno de la misma,

e) una secuencia que codifica un dominio Fv monocatenario o uno Fab.

30 12. Una biblioteca de acuerdo con las reivindicaciones 10-11, en la que dichos plásmidos o amplicones de PCR de ADN bicatenario comprenden además una secuencia que codifica una enzima transposasa que reconoce las secuencias de repeticiones terminales invertidas y es funcional con ellas.

35 13. Un método para generar una biblioteca de polinucleótidos transponibles que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidad, que comprende generar una colección diversa de polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, en donde dichos polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que son reconocidas por al menos una enzima transposasa y son funcionales con ella.

40 14. Un vector que comprende una secuencia que codifica una región VH o VL de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que son reconocidas por al menos una enzima transposasa y son funcionales con ella.

15. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 14.

45 16. Un método para generar una población de células hospedadoras capaces de expresar polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, que comprende:

50 (i) generar una colección diversa de polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican polipéptidos que tienen diferentes especificidades de unión o funcionalidades, en donde dichos polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una especificidad de unión o funcionalidad dispuesta entre secuencias de repeticiones terminales invertidas que son reconocidas por al menos una enzima transposasa y son funcionales con ella; y

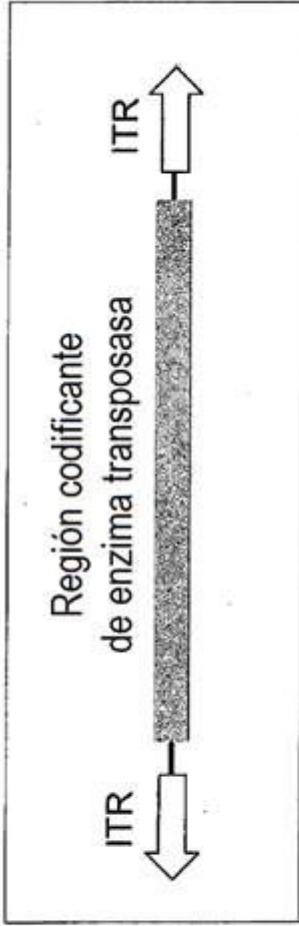
(ii) introducir dicha colección diversa de polinucleótidos en células hospedadoras.

55 17. El método o el vector de acuerdo con las reivindicaciones mencionadas 2-16, en el que el vector que comprende la secuencia VH comprende secuencias de repeticiones terminales invertidas que son reconocidas por una enzima transposasa diferente de las secuencias de repeticiones terminales invertidas en el vector que comprende la secuencia VL.

60 18. Un método o una célula hospedadora de acuerdo con las reivindicaciones mencionadas 1-12, 15-17, en donde las células hospedadoras son células de vertebrados, preferentemente células de mamífero, más preferentemente células humanas o de roedores, aún más preferentemente células linfoides, aún más preferentemente linfocitos B, incluso más preferentemente linfocitos B progenitores o linfocitos B precursores, particularmente preferentemente linfocitos B progenitores o linfocitos B precursores transformados con virus de la leucemia murina de Abelson y linfocitos proB y preB humanos transformados con VEB sin inmunoglobulina, tempranos.

65

Fig. 1: a.) elemento transponible autónomo (TE):



b.) sistema de vector de transposición y bicomponente

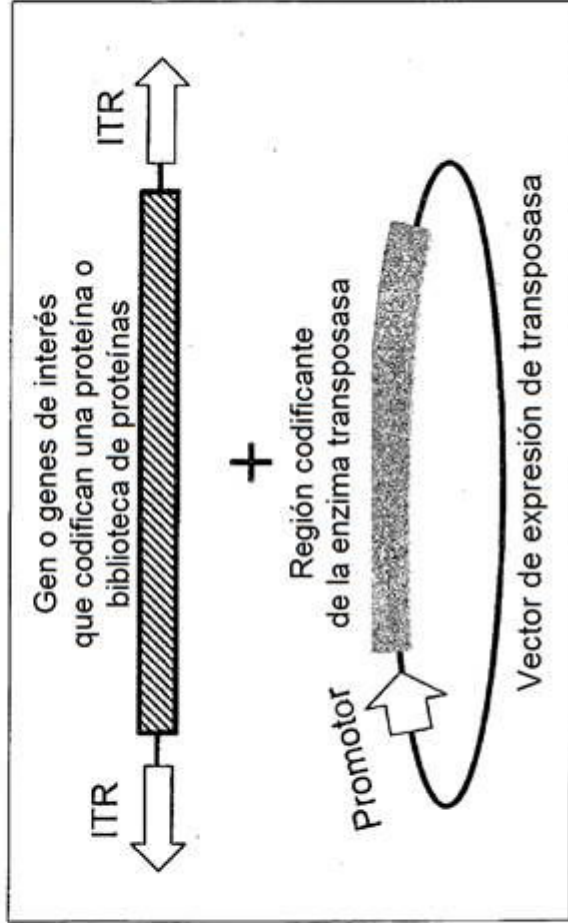


Fig. 3:

Familia del transposon (Transposon)	Especie de origen	Serie de células hospedadoras
PiggyBac	<i>Trichoplusia ni</i>	Ratón, ser humano, cerdo
Tci-mariner/ (<i>Sleeping Beauty</i>)	salmonid	Pez cebra, <i>Xenopus</i> , ratón, ser humano
(Frog Prince)	<i>R. pipiens</i>	Ser humano, hámster, <i>Xenopus</i> , pez cebra
(Himar1)	<i>H. irritans</i>	Ser humano
(Passport)	<i>P. platessa</i>	Ser humano, mono, hámster, pavo, pollo, cerdo
(Minos)	<i>D. hydei</i>	Ser humano, ratón
hAT (Tol1, Tol2)	<i>O. latipes</i>	Pez cebra, <i>Xenopus</i> , ratón, ser humano, pollo
Ac/Ds	<i>Z. mays</i>	Pez cebra, ser humano
PIF, Harbinger, Harbinger3-DR	<i>D. rerio</i>	Pez cebra, ser humano
(Hsmar1)	<i>H. sapiens</i>	Ser humano, pez cebra

Fig. 4

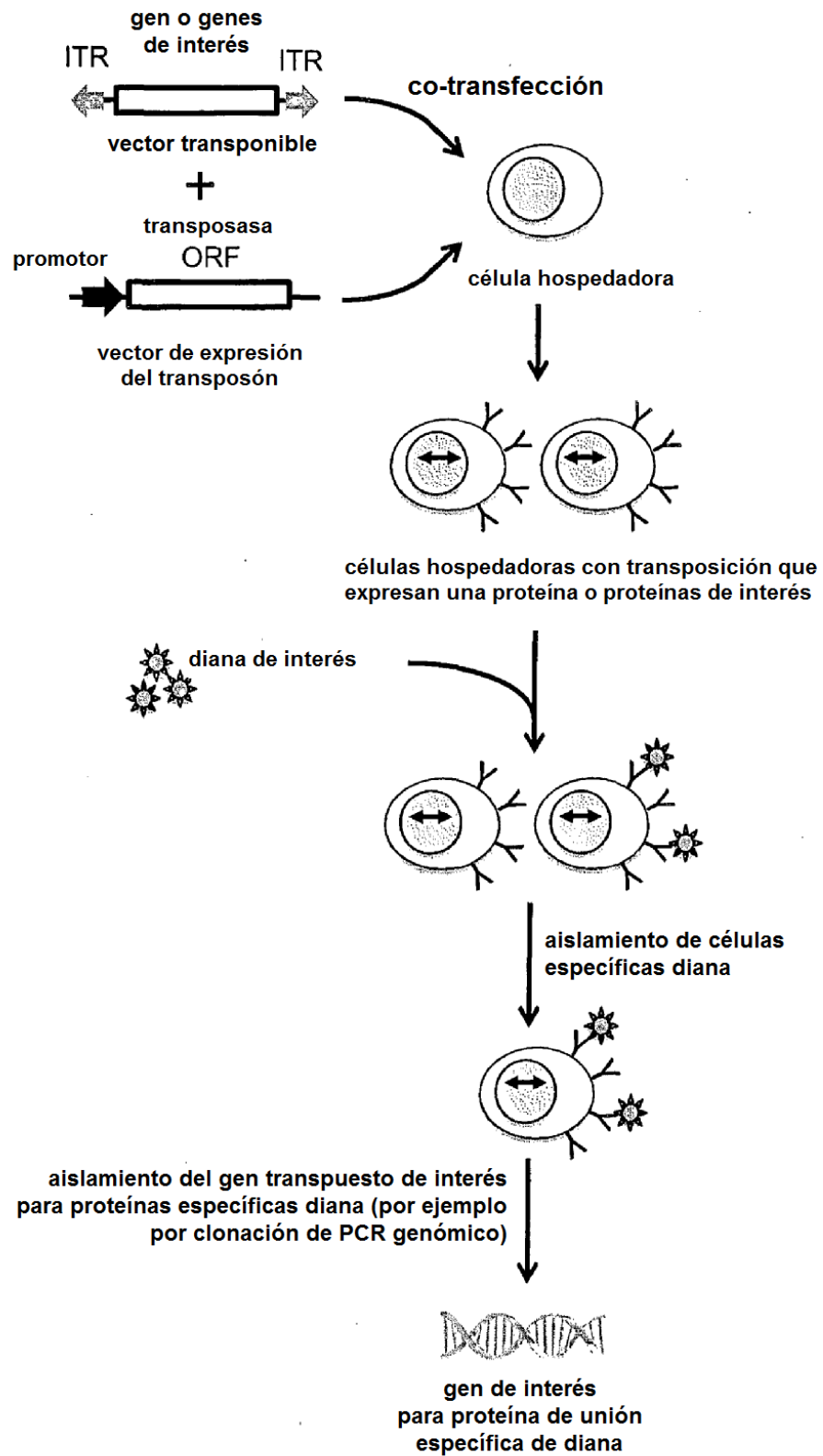


Fig. 5 a)

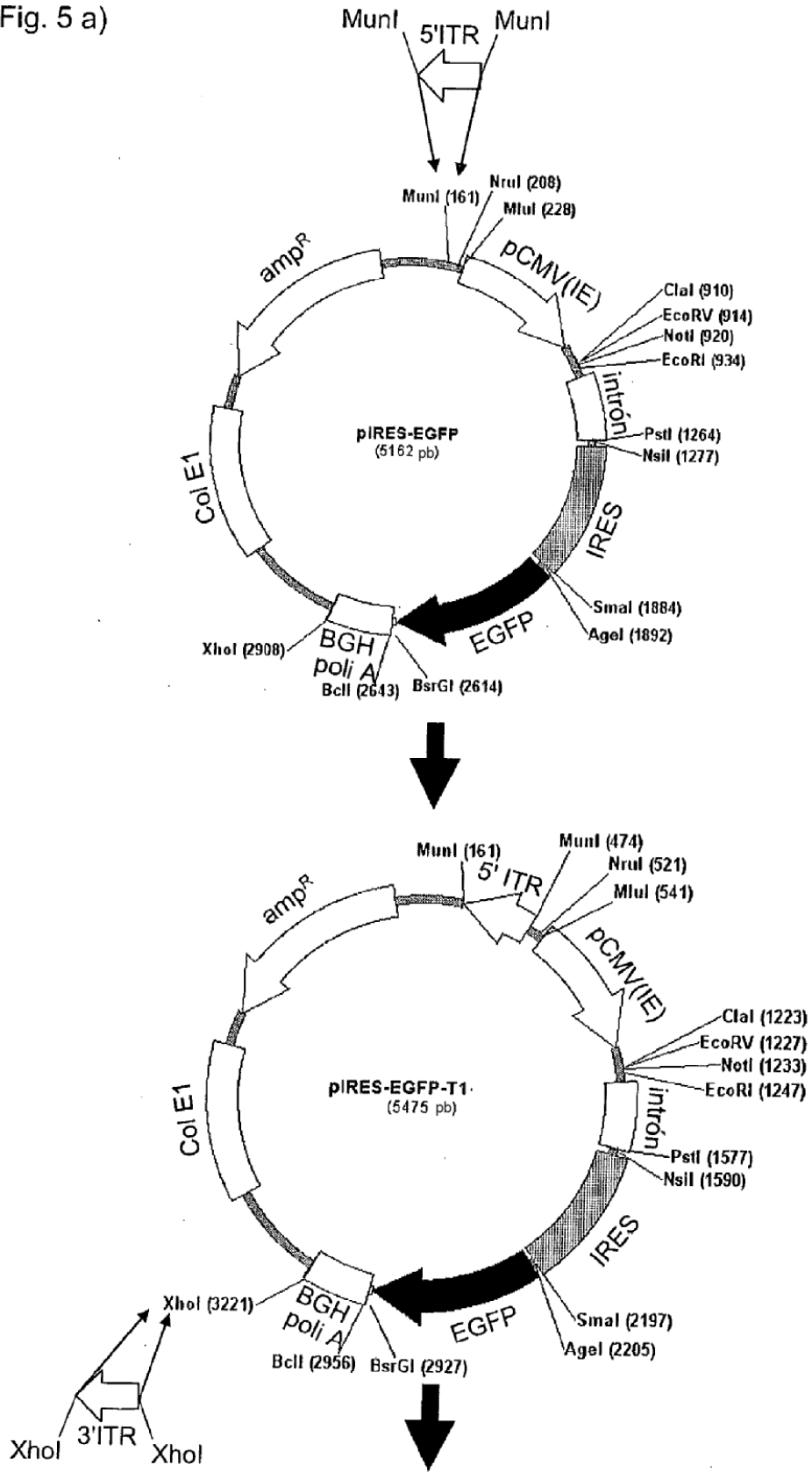


Fig. 5 b)

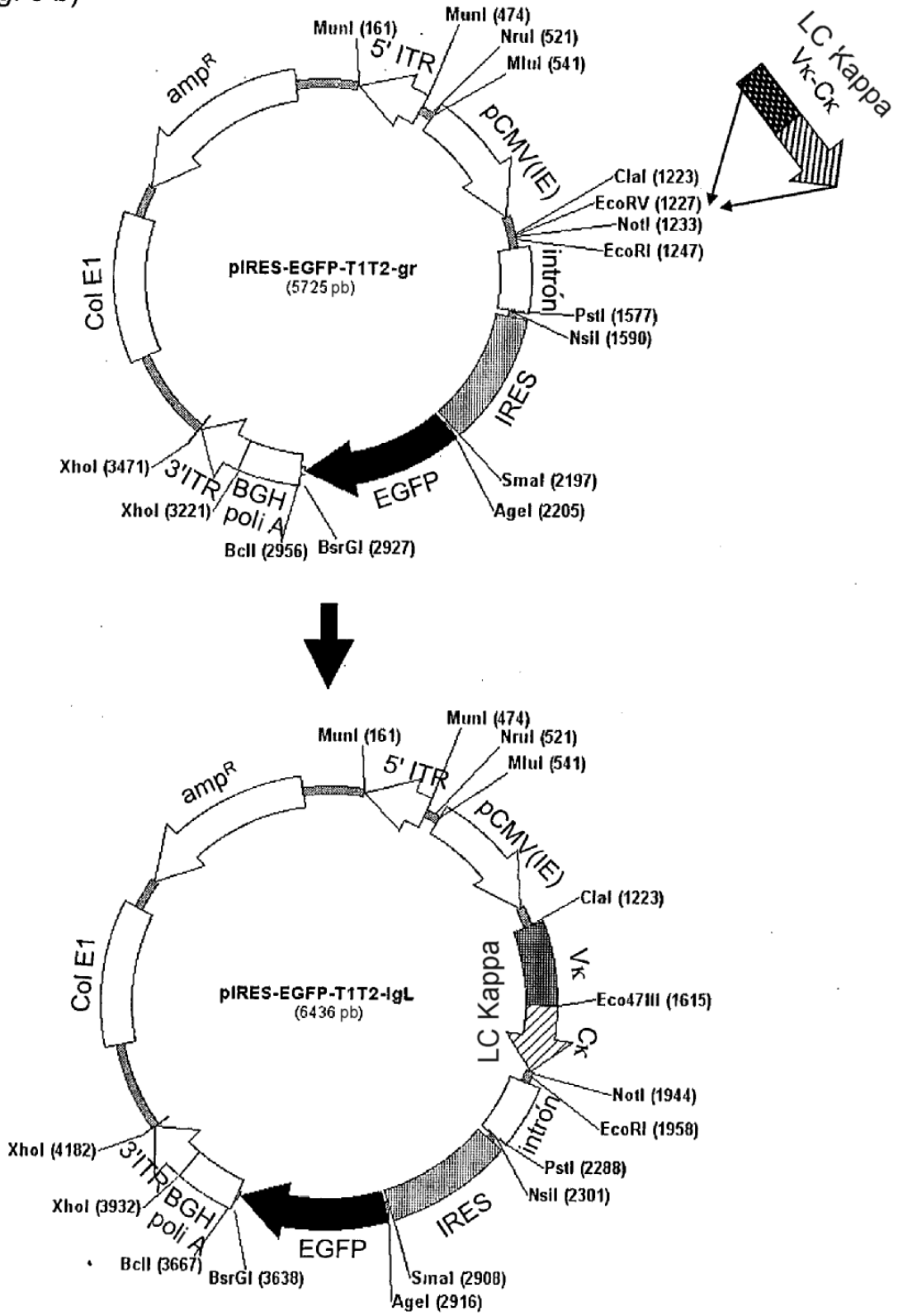


Fig. 6

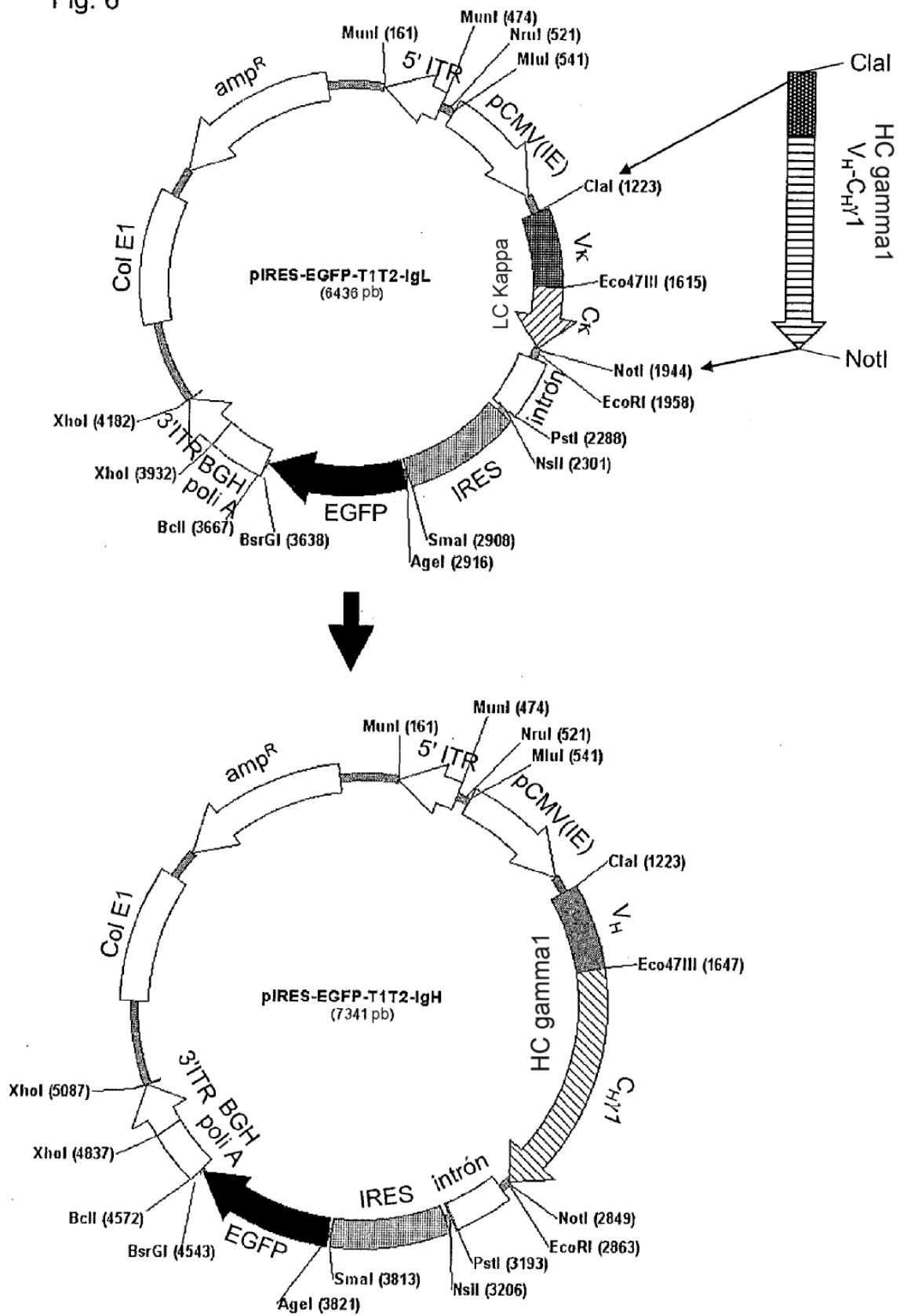


Fig. 7

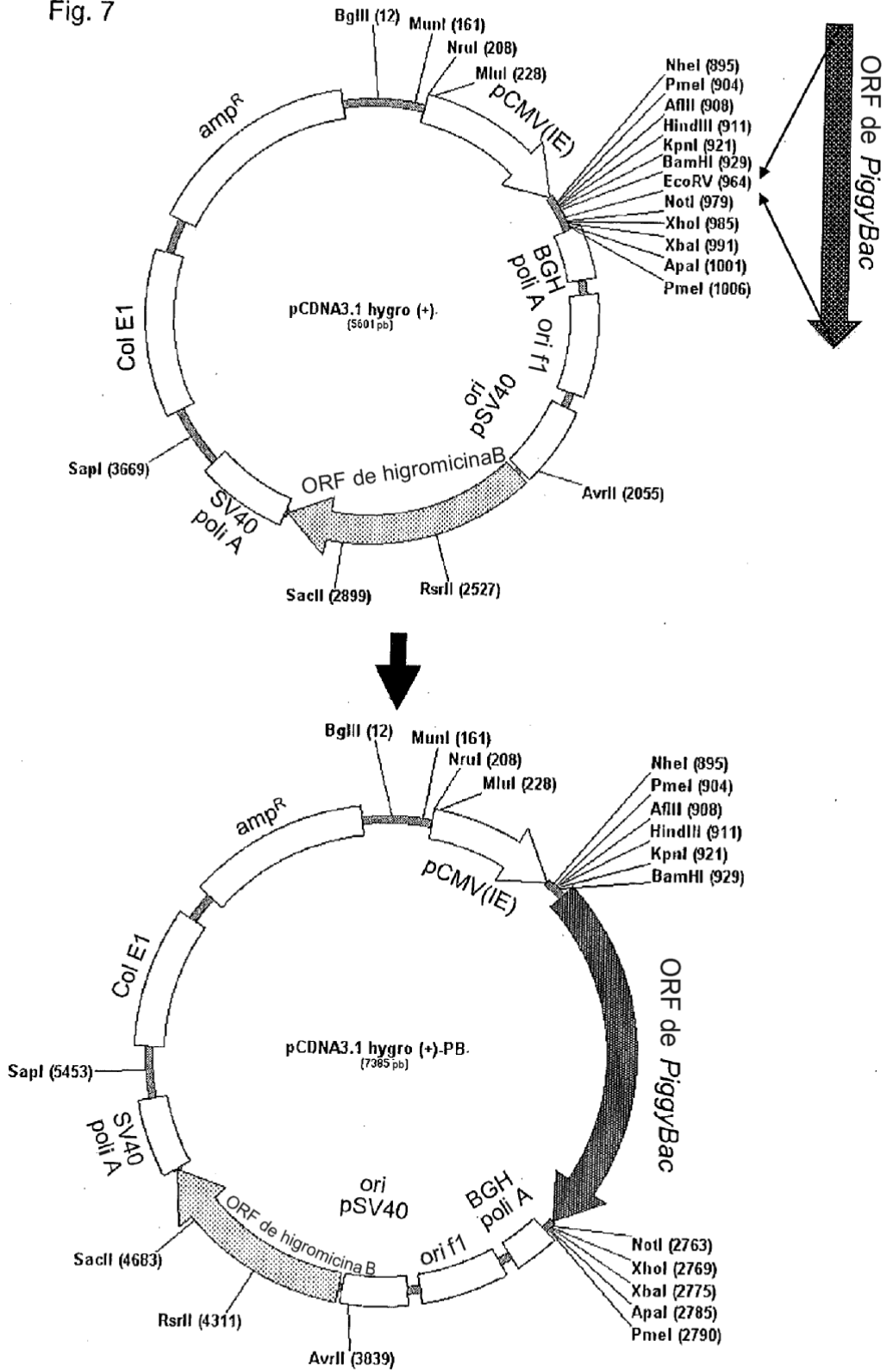


Fig. 8

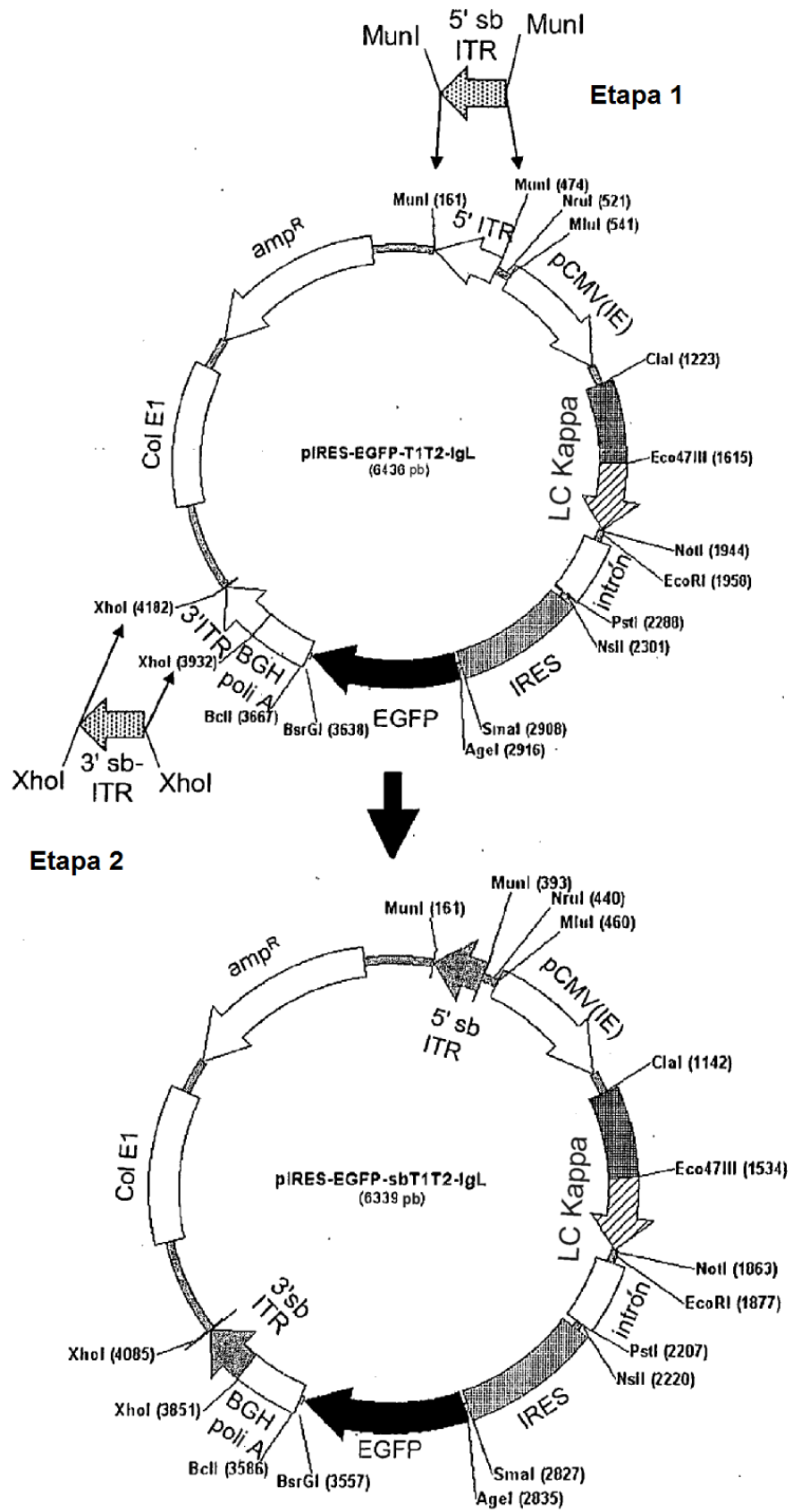


Fig. 9

