



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 187 320**

② Número de solicitud: 200001806

⑤ Int. Cl.7: **C07K 14/00**
A61K 48/00
C12N 15/87

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **20.07.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2003**

Fecha de la concesión: **30.07.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.2004**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.09.2004

⑰ Titular/es:
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Medplant Genetics, S.L. y
Jesús Fominaya Gutiérrez

⑱ Inventor/es: **Fominaya Gutiérrez, Jesús;**
Bernad Miana, Antonio;
Simón Buela, Laureano y
Gasset Vega, María Angustias

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Péptido catiónico anfipático y su aplicación en vectores de transferencia génica.**

㉒ Resumen:

Péptidos catiónicos anfipáticos y su aplicación en vectores de transferencia génica.

Estos péptidos comprenden unos restos de aminoácidos básicos, alifáticos y aromáticos, unos restos de aminoácidos básicos en los dos extremos del péptido y, preferentemente, un resto de un aminoácido aromático en la posición 3 de la secuencia del péptido. Estos péptidos tienen simultáneamente la capacidad de unir un polinucleótido y alterar membranas biológicas y son útiles para construir vectores no virales de transferencia génica, con una capacidad de condensación de material genético mejorada, y/o con una citotoxicidad reducida y/o con una eficiencia de transferencia de material genético mejorada. De aplicación en la transferencia génica con fines experimentales y terapéuticos.

ES 2 187 320 B1

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

DESCRIPCION

Péptido catiónico anfipático y su aplicación en vectores de transferencia génica.

Campo de la invención

La presente invención se incluye dentro del área de la Biotecnología y de la Biomedicina, y se relaciona, en general, con el transporte de ácidos nucleicos al interior celular (transferencia génica) y sus aplicaciones tanto en el área experimental (transfecciones) como terapéutica (terapia génica). En particular, la invención se refiere a nuevos péptidos catiónicos anfipáticos útiles como sistemas de transferencia de genes y a los vectores no virales que comprenden dichos péptidos.

Antecedentes de la invención

La introducción de material genético exógeno en células es una etapa clave en el desarrollo de la investigación básica en biología celular. El término "transfección" se ha acuñado para indicar la transferencia de DNA a células en cultivo de organismos superiores y su puesta en práctica es una herramienta de uso indispensable para un número elevado y creciente de investigadores. La aplicación directa de esta tecnología en organismos vivos abre nuevas posibilidades de expansión, entre las que se incluye la cada vez más popular terapia génica.

Los vectores virales de transferencia de DNA han atraído la atención de los especialistas en terapia génica y son la base de la práctica mayoría de los ensayos clínicos en marcha actualmente [Anderson WF. *Nature* 1998; 392: 25-30] aunque los niveles de eficiencia pueden ser muy variables y puede existir el riesgo de respuesta inmune severa frente a elementos del vector viral.

Sin embargo, los vectores no virales parecen tener más éxito como agentes de transferencia génica debido a que son más fáciles de manejar y a que poseen un mayor rango de aplicaciones. El desarrollo exponencial en este campo revela un prometedor futuro para los vectores no virales como una alternativa lógica a los vectores virales para la terapia génica, proporcionando ventajas similares y, eliminando los inconvenientes inherentes a los virus. El término "no viral" es un concepto que engloba a una gran variedad de estructuras no relacionadas, tales como conjugados de polilisina, policationes lineales y ramificados, dendrímeros completos o fracturados, nanoesferas, polisacáridos, liposomas catiónicos, proteínas de fusión modular y péptidos.

Por tanto, de los sistemas de transferencia génica tradicionales (DEAE-dextrano, fosfato cálcico, electroporación, etc.) se ha ido evolucionando hacia estructuras poliméricas de naturaleza diversa que poseen como denominador común su elevada carga positiva (policationes). Esta nueva generación de agentes de transferencia incluye polímeros lineales o ramificados, dendrímeros y liposomas catiónicos, siendo estos últimos los que han dado lugar a la aparición de un mayor número de alternativas en explotación comercial, entre las que se encuentran Lipofectina[®] (Gibco BRL), Lipofectamina[®] (Gibco BRL), Lipofectace[®] (Gibco BRL), DOTAP (Boehringer Mannheim, Ind.), Lipofectamina Plus[®], GenePor-

ter[®] y FuGene[®].

Sin embargo, el uso de péptidos como vectores de transferencia génica está en su período inicial de investigación y desarrollo. Los péptidos ofrecen simplicidad, facilidad de producción y un correcto control de su composición comparados con la mayoría de los restantes vectores no virales, los cuales se basan en complejas, y frecuentemente mal definidas estructuras de naturaleza polimérica. Los péptidos fueron inicialmente utilizados como potenciadores de otros sistemas, aportando su capacidad fusogénica [Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner W. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 12918-12924]. Actualmente, los péptidos ofrecen otras funciones subsecuentemente aprovechadas, incluyendo el reconocimiento celular y la unión a DNA, lo que les convierten en verdaderos vectores de transferencia génica, ya sea en solitario o en asociación con otras estructuras [Hart SL, Collins L, Gustafsson K, Fabre JW. *Gene Ther.* 1997; 4: 1225-1230; Niidome T, Ohmori N, Ichinose A, Wada A, Mihara H, Hirayama T, et al. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 15307-15312]. Entre las ventajas de los péptidos se pueden considerar 1) su naturaleza biológica, 2) su biodegradabilidad, 3) la posibilidad de realizar modificaciones, que a su vez permiten la incorporación de estructuras adicionales para conferir nuevas características (solubilidad, estabilidad, especificidad, etc), y 4) su pequeño tamaño molecular.

La incorporación de estas actividades esenciales junto con la supervivencia en la circulación sanguínea, la unión y compactación del DNA, el reconocimiento y unión a la superficie celular, el transporte del material genético a través de la membrana celular hacia el citosol y el tropismo por el núcleo es un objetivo común en el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de transferencia génica. Cada uno de estos requisitos puede encontrarse en unidades estructurales, funcionalmente independientes, que combinadas en forma de módulos, generan vectores de transferencia óptimos y específicos [Fominaya J, Wels W. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 10560-10568], o, alternativamente, también es posible encontrar o diseñar una estructura mínima en la que coexistan a modo de motivo todos los requisitos para llevar a cabo dichas funciones. Un denominador común de las actividades mencionadas es el requerimiento de cargas positivas, que (i) permiten establecer interacciones iónicas con los fosfatos nucleotídicos e inducir su compactación, (ii) permiten reconocer componentes ácidos presentes en las membranas (proteoglicanos, lípidos ácidos, etc.), facilitando los fenómenos de permeabilización de membranas, e incluso (iii) favorecen el tropismo nuclear.

El péptido KALA [Wyman TB, Nicol F, Zelphati O, Scaria PV, Plank C, Szoka FC Jr. *Biochemistry* 1997; 36: 3008-3017], útil como sistema de transferencia génica, combina simultáneamente en la misma molécula peptídica la capacidad de unir DNA y de alterar membranas. Sin embargo, dicho péptido, tiene una capacidad de condensación de material genético relativamente pobre, una citotoxicidad relativamente grande y una eficiencia de transferencia de material genético re-

lativamente pequeña, lo que limita su potencial aplicación.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de obtener nuevos vectores no virales para la transferencia de material genético, y, en particular, con el problema de buscar nuevos vectores no virales de transferencia de genes basados en péptidos catiónicos que combinen simultáneamente la capacidad de unir polinucleótidos y alterar membranas biológicas, con una capacidad de condensación de material genético mejorada, y/o con una citotoxicidad reducida y/o con una eficiencia de transferencia de material genético mejorada.

La solución presentada por esta invención se basa en que los inventores han observado que la combinación de dos o más características seleccionadas entre el empleo de unos restos de aminoácidos básicos (arginina) en lugar de otros (lisina), la modificación del ángulo de dichos restos de aminoácidos con respecto al eje de la hélice, la ausencia de restos de aminoácidos ácidos, la colocación de unos restos de aminoácidos básicos en los dos extremos del péptido y la colocación de, preferentemente, un resto de un aminoácido aromático en la posición 3 de la secuencia del péptido, se puede obtener un péptido catiónico, anfipático, pequeño, que tiene simultáneamente la capacidad de unir un polinucleótido y alterar membranas biológicas, útil para la construcción de un vector no viral de transferencia, con una capacidad de condensación de material genético mejorada, y/o con una citotoxicidad reducida y/o con una eficiencia de transferencia de material genético mejorada. La eficiencia en la transferencia de material genético de dicho vector es muy alta y comparable favorablemente con la de otros sistemas de transferencia génica bien establecidos y/o comerciales. La ausencia de inhibición por componentes del suero y la baja toxicidad de este nuevo vector sitúan al mismo en una situación ventajosa para su aplicación *in vivo*.

La capacidad de un péptido desarrollado en esta invención para unir y condensar material genético se muestra en los Ejemplos 2 y 3, mientras que en el Ejemplo 4 se ilustra su capacidad para interactuar con membranas biológicas. Los Ejemplos 5 y 6 muestran la eficacia del péptido desarrollado en esta invención para transferir material genético y ponen de manifiesto que dicha eficiencia es equivalente o superior a la obtenida mediante otros sistemas conocidos (utilizando el gen de la luciferasa como gen indicador se han obtenido valores de actividad superiores a 10^{10} URL/mg de proteína). El Ejemplo 7 ilustra una posible aplicación *in vivo* de un vector no viral proporcionado por esta invención y el empleo de un compuesto potenciador de la permeabilización (capacidad permeabilizadora del péptido) de membranas, tal como un péptido fusogénico. La ausencia de inhibición por componentes séricos y su baja toxicidad convierten al vector no viral de transferencia génica proporcionado por esta invención en una opción ventajosa para potenciales aplicaciones *in vivo*.

Por tanto, un objeto de esta invención, lo constituye un péptido catiónico, anfipático, que

tiene simultáneamente capacidad de unir polinucleótidos y alterar membranas biológicas. Un procedimiento, sintético o recombinante, para la obtención de dicho péptido constituye un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un vector no viral de transferencia génica que comprende dicho péptido y un polinucleótido acoplado (no covalentemente) a dicho péptido.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una célula transfectada con dicho vector no viral de transferencia génica.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una composición que comprende dicho vector no viral de transferencia génica.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende dicho vector no viral de transferencia génica.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la introducción *in vitro* de un polinucleótido en una célula que comprende poner en contacto a dicha célula con dicho vector no viral de transferencia génica o con dicha composición que lo contiene.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicho péptido en la elaboración de un vector no viral de transferencia génica.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicho péptido en la elaboración de una composición farmacéutica, adecuada para terapia génica, que comprende un vector no viral de transferencia génica que contiene a dicho péptido adecuada para terapia génica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A ilustra la unión del péptido RAWA a DNA analizada mediante electroforesis en geles de agarosa (Ejemplo 2). La Figura 1B es una gráfica en la que se recoge la unión de los péptidos RAWA y KALA a DNA, estudiada mediante medidas de extinción de la fluorescencia del triptófano del péptido (Qobs) en función de la relación de carga (Ejemplo 3). La Figura 1C es una gráfica que muestra la extensión de la condensación de DNA inducida por los péptidos RAWA y KALA determinada como porcentaje del desplazamiento del agente intercalante bromuro de etidio (Ejemplo 3). En las Figuras 1B y 1C se han representado los avales para el péptido RAWA mediante puntos blancos, mientras que los valores para el péptido KALA se han representado mediante puntos negros.

La Figura 2 ilustra la capacidad de interacción con membranas de los péptidos RAWA y KALA. La Figura 2A es la representación de la variación del porcentaje de mezcla de lípidos inducida por RAWA (puntos blancos) y por KALA (puntos negros) en función de la relación molar péptido/fosfolípido. La Figura 2B es una gráfica que recoge la capacidad permeabilizadora de membranas, medida como porcentaje de liberación del contenido intravesicular, inducida por RAWA (puntos blancos) y por KALA (puntos negros) en función de la relación molar péptido/fosfolípido. La Figura 2C es una gráfica que muestra la disminución de la actividad permeabi-

lizadora de membranas de las mezclas del péptido RAWA y de DNA, con respecto a la de RAWA libre, en función de la relación de carga, a las relaciones molares péptido total a lípido de 0,003 (puntos blancos) y 0,005 (puntos negros).

La Figura 3A es una gráfica que muestra la práctica ausencia de toxicidad celular derivada del empleo de RAWA, cuando se realiza un estudio comparativo entre vectores de transferencia de genes basados en los péptidos RAWA y KALA, evaluando el porcentaje de viabilidad celular en función de la relación de carga (CR) de los complejos empleados. La Figura 3B es un diagrama de barras que demuestra la capacidad de RAWA para actuar como vector de transferencia génica, evaluada como la capacidad de inducir la actividad enzimática de la proteína codificada por el gen transportado (indicador) y expresada en unidades relativas de luz/mg de proteína total celular (URL/mg), en adelante "transporte funcional", es decir, el polinucleótido se introduce en la célula y ejerce la función para la que había sido destinado. La capacidad de transporte funcional en RAWA es muy superior a la del péptido empleado como referencia (KALA).

La Figura 4 ilustra las características de transferencia génica mediada por RAWA. La Figura 4A es un diagrama de barras en el que se recoge la capacidad de transporte funcional, en relación con el valor obtenido en un tratamiento con cloroquina, obtenida con los vectores de transferencia génica basados en el péptido RAWA en función de la relación de carga de los mismos. La Figura 4B es un diagrama de barras en el que se recoge la capacidad de transporte funcional, en relación con el valor obtenido en un tratamiento con cloroquina, de los vectores de transferencia de genes basados en el péptido RAWA en función de la relación de carga; opcionalmente en presencia de cloroquina o de péptido libre [se prepararon peptiplexes (complejos péptido-DNA) a una CR (+/-) 2 y 20 y se ensayaron utilizando el protocolo convencional; las células tratadas con peptiplex CR(+/-) 2 se incubaron conjuntamente bien con cloroquina 50 μ M (2+Ch) o con una cantidad adicional de péptido libre equivalente a la utilizada para la preparación del peptiplex CR(+/-) 20].

La Figura 5 ilustra el efecto de la dosis de DNA en la eficiencia de la transferencia de DNA mediada por el péptido RAWA. La Figura 5A es un diagrama de barras que ilustra el efecto de la dosis de DNA sobre el transporte funcional del vector RAWA-DNA formado a una relación de carga 4 (+/-). La Figura 5B es un diagrama de barras en el que se recoge el efecto de la relación de carga de los vectores de transferencia basados en RAWA sobre el grado de transporte funcional empleando 0,5 μ g de DNA.

La Figura 6 ilustra el potencial del péptido RAWA como sistema eficaz de transferencia génica. La Figura 6A es un diagrama de barras que muestra los resultados de un estudio comparativo del péptido RAWA con los mejores reactivos de transferencia conocidos empleando el sistema celular COS-7 como referencia. Las abreviaturas empleadas son: CaPh, protocolo optimizado de fosfato cálcico [Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 596-601], PEI,

polietilenimina [Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 7297-7301]; SF, Superfect; LF+, Lipofectamine Plus; GP, GenePorter; y FG, FuGene. Todos ellos se prepararon con 2 μ g de pSV2LUC siguiendo los protocolos específicos y las recomendaciones de los fabricantes. La Figura 6B es un diagrama de barras que muestra el efecto del contexto celular en la actividad de transferencia de DNA mediada por RAWA; para ello las diversas líneas celulares de mamífero se trataron bajo condiciones convencionales con vectores de transferencia constituidos por 2 μ g de pSV2LUC y RAWA a una relación de carga de 4 (+/-), empleando como control paralelo igual cantidad de DNA transportado por Lipofectamine Plus (barras de puntos).

La Figura 7 es un diagrama de barras que ilustra la optimización de los vectores de transferencia génica basados en RAWA para aplicaciones *in vivo* incluyendo terceros componente para superar la limitación impuesta por la necesidad de RAWA libre para perturbar la membrana. Como tercer componente se empleó el péptido fusogénico JTS-1. Esta figura recoge el transporte funcional empleando como vectores de transferencia en células COS-7: 1) complejo RAWA/DNA convencional a CR (+/-) 4 [DNA/RAWA (1:4)]; 2) el mismo complejo incubado con JTS-1 antes de la adición a las células [[DNA/RAWA] JTS-1 (1:4:2)]; 3) el complejo ternario preparado por preincubación de los péptidos antes de la adición de DNA [[RAWA/JTS-1] DNA (4: 2: 1)]; y 4) el peptiplex binario estándar y libre de JTS-1, que se añadió a continuación, en la misma cantidad que la utilizada para la formación del complejo ternario [DNA/RAWA (1:4) + JTS-1 (2)].

Descripción detallada de la invención Péptido

La invención proporciona un péptido catiónico, anfipático, que tiene simultáneamente la capacidad de unir un polinucleótido y membranas biológicas, en adelante, péptido de la invención, que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula general (I)

aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6-aa7-aa8-aa9-aa10-aa11-aa12-aa13-aa14-aa15-aa16-aa17-aa18-aa19-aa20-aa21-aa22-aa23

donde

aa1, aa5, aa9, aa12, aa16, aa19 y aa23, iguales o diferentes, independientemente entre sí, representan el resto de un aminoácido básico seleccionado entre arginina, lisina y ornitina;

aa2, aa3, aa4, aa6, aa7, aa8, aa10, aa11, aa13, aa14, aa15, aa17, aa18, aa20, aa21 y aa22, iguales o diferentes, independientemente entre sí, representan el resto de un aminoácido hidrófobo seleccionado entre los aminoácidos alifáticos glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, y los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina;

aa1 es el resto del aminoácido del extremo amino y aa23 es el resto del aminoácido del extremo carboxilo.

Cada uno de los aminoácidos aa1 a aa23 puede tener, independientemente; la configuración D o L. En una realización particular, todos los aminoácidos son D-aminoácidos.

El péptido de la invención puede estar formado por unidades repetidas de la secuencia de fórmula general (I), consecutivas y/o espaciadas por secuencias flexibles o ricas en prolina. En este caso, las secuencias de fórmula general (I) pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por tanto, en una realización particular, el péptido de la invención comprende dos o más secuencias de fórmula general (I) unidas entre sí, independientemente, de forma consecutiva o espaciadas por secuencias flexibles o ricas en prolina.

Una clase preferida de péptidos de fórmula (I) está constituida por aquellos péptidos (I) en los que al menos uno de aa1, aa5, aa9, aa12, aa16, aa19 o aa23 es un resto de arginina.

Otra clase preferida de péptidos de fórmula (I) está constituida por aquellos péptidos (I) en los que aa3 es un resto de un aminoácido aromático, preferentemente, triptófano.

En una realización particular, el péptido de la invención tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1. Este péptido ha sido denominado RAWA (por sus cuatro primeros restos de aminoácidos del extremo amino) y servirá como referencia para ilustrar la naturaleza de esta invención.

El péptido RAWA es un péptido catiónico, anfipático, capaz de formar una hélice anfipática cuya cara polar la constituyen los restos de aminoácidos de carácter básico (catiónico). Su carácter anfipático contribuye a generar una actividad desestabilizadora o perturbadora de membranas biológicas. A diferencia de otros vectores de transferencia génica, el péptido RAWA es de pequeño tamaño molecular y se asemeja a los agentes naturales de condensación de DNA (protaminas, HMGs). El péptido RAWA es capaz de unir y compactar polinucleótidos así como de alterar la permeabilidad de membranas. De hecho, el péptido RAWA interacciona espontáneamente con polinucleótidos y forma complejos estables que se unen a membranas celulares y posibilitan la introducción efectiva del material genético. Este péptido es soluble en soluciones acuosas y tiene una estructura helicoidal aproximadamente de un 40% determinada por dicroísmo circular [Ejemplo 1].

A diferencia del péptido KALA, el péptido de la invención incluye una serie de características que incrementan la capacidad de unión y condensación de polinucleótidos y reducen la toxicidad celular, manteniendo la capacidad anfipática necesaria para la unión a membranas biológicas. Entre estas características se encuentran (i) la ausencia de restos de aminoácidos ácidos y la modificación de los extremos del péptido con el fin de mantener las cargas positivas, evitando de ese modo la presencia de estructuras adicionales fuera de los bordes de interacción que pudieran alterar la potencial capacidad de condensación de polinucleótidos, y (ii) la introducción de un aminoácido aromático en la posición 3 (aa3) que parece ejercer un efecto en el anclaje del péptido a la membrana biológica.

De forma más concreta, uno de los péptidos preferidos de esta invención, el péptido RAWA presenta las siguientes características en relación con el péptido KALA:

- 5 - contiene restos de arginina en lugar de restos de lisina, con lo que se obtienen la estructura y características de pKa favorables del grupo guanidinio para interacciones con el polinucleótido, al igual que sucede en las protaminas (agentes condensantes de origen natural muy eficientes); además, la capacidad de transfección de polipéptidos de tipo poli-Arg parece ser mayor que la de péptidos poli-Lys [Emi N., Kidoaki S, Yoshikawa K, Saito H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 231 421-424];
- 10 - el patrón helicoidal ha sido modificado, colocando al aminoácido Arg en un ángulo de 100° con respecto al eje de la hélice;
- 15 - carece de restos de aminoácidos ácidos y los extremos amino y carboxilo del péptido contienen unos restos de aminoácidos básicos que aportan cargas positivas, evitándose así la presencia de estructuras adicionales fuera de los bordes de interacción que pudieran alterar la potencial capacidad de condensación; y
- 20 - contiene un resto de triptófano en la posición 3 (aa3) que parece colaborar en el anclaje del péptido a la membrana biológica [de Planque MR, Kruijtz JA, Liskamp RM, Marsh D, Greathouse DV, Koeppe RE, et al. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 20839-20846; Braun P, and von Heijne G. *Biochemistry.* 1999; 38: 9778-9782], facilita la cuantificación y parece incrementar las propiedades de transferencia génica, [Wadhwa MS, Collard WT, Adami RC, McKenzie DL, Rice KG. *Bioconjug. Chem.* 1997; 8: 81-88].

50 La combinación de todas o algunas de las características mencionadas previamente ha conducido, sorprendentemente, al desarrollo del péptido de la invención, es decir, un péptido catiónico, anfipático, pequeño, que tiene simultáneamente la capacidad de unir un polinucleótido y alterar membranas biológicas, útil para la construcción de un vector no viral de transferencia génica, con una capacidad de condensación de material genético mejorada, y/o con una citotoxicidad reducida y/o con una eficiencia de transferencia de material genético mejorada.

55 El péptido de la invención puede ser obtenido bien por síntesis química utilizando la metodología convencional de síntesis en fase sólida, por ejemplo, con química Fmoc estándar [Gausepohl H, Boulin C, Kraft M, Frank RW. *Pept. Res.* 1992; 5: 315-320; King DS, Fields CG, Fields GB. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990; 36: 255-266], o bien mediante técnicas de DNA recombinante, por ejemplo, por expresión en un sistema de expresión adecuado de una secuencia de DNA que codifica el péptido de la invención o proteínas de fusión o no que lo contengan. Por consiguiente,

la invención proporciona, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica para el péptido de la invención, así como un procedimiento para la obtención de un péptido de la invención que comprende la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico en un sistema de expresión apropiado.

El péptido de la invención puede ser utilizado en la construcción de un vector no viral de transferencia génica debido a sus propiedades de unión y condensación de polinucleótidos, unión a membranas biológicas y transferencia de polinucleótidos al interior celular, tal como se describirá con mayor detalle a continuación.

Vector no viral de transferencia génica

La invención también proporciona un vector no viral de transferencia génica, en adelante vector de la invención, que comprende un péptido de la invención y, un polinucleótido acoplado no covalentemente a dicho péptido.

El polinucleótido que puede utilizarse en el vector de la invención comprende cualquier ácido nucleico y sus mezclas, por ejemplo, moléculas de DNA, RNA, o híbridos de las mismas [tanto entre dichas moléculas (híbridos DNA-RNA) como entre dichas moléculas y, PNA (por ejemplo, híbridos PNA-DNA)]; con estructuras lineales o circulares; monocatenarias, bicatenarias o multicatenarias, por ejemplo tricatenarias o tetracatenarias. Dicho polinucleótido incluye polidesoxirribonucleótidos conteniendo 2'-desoxi-D-ribosa o formas modificadas de la misma, polirribonucleótidos conteniendo D-ribosa o formas modificadas de la misma, así como cualquier tipo de polinucleótido tal como un N-glicósido o C-glicósido de una purina o de una pirimidina, opcionalmente modificada. El polinucleótido puede codificar regiones promotoras, operadoras, estructurales o terminadoras de genes, o una combinación de dichas regiones, así como cualquier material codificante o no, pero genéticamente relevante.

En una realización particular, el polinucleótido forma parte de un cromosoma artificial. En otra realización particular, dicho polinucleótido es un ácido nucleico con valor terapéutico, por ejemplo, un polinucleótido antisentido, o un polinucleótido que codifica un producto (proteína o péptido) con actividad enzimática, o un producto que, una vez en la célula, modifique la fisiología celular o una situación patológica, o una mezcla de los mismos. Para prolongar su actividad, el polinucleótido puede tener la totalidad o parte de las uniones de sus nucleótidos estabilizados mediante uniones de tipo no-fosfodiéster, por ejemplo, fosforotioato, etc. [patente norteamericana US 5.990.089, cuya descripción se incluye como referencia].

A modo de ejemplo, la capacidad de unión de un péptido de la invención, en particular del péptido RAWA, a un polinucleótido, así como la capacidad de condensación y transferencia de material genético del mismo, se ha comprobado utilizando como gen indicador el gen de la luciferasa.

El vector de la invención presenta la totalidad o la mayor parte de las ventajas de los distintos sistemas de transferencia de genes conocidos hasta la fecha, relacionadas con la capacidad de condensación de polinucleótidos, unión a membranas biológicas, transporte a través de las mis-

mas y tamaño del transportador.

El vector de la invención presenta una buena capacidad de unión y condensación de polinucleótidos, lo cual constituye una característica crítica para incrementar la estabilidad del material genético y reducir el tamaño de los complejos péptido-polinucleótido (peptiplexes), y superior a la de otros sistemas conocidos, por ejemplo, la capacidad de condensación de polinucleótidos del péptido RAWA es superior a la del sistema basado en el empleo del péptido KALA (Ejemplo 3); en ese caso, parece ser que la presencia de restos del aminoácido básico arginina como restos catiónicos (que aportan grupos guanidinio) para la interacción con los aniones fosfato presentes en el polinucleótido permite un equivalente correcto para la interacción péptido-polinucleótido cuando se compara con un grupo amino, basado en la característica unión paralela "hidrógeno zwitteriónico" con el grupo fosfato y con la potencialidad de formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas [Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergley L, Bradley JC, Basseville M, Lehn P, Lehn J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **93**: 9682-9686]; los resultados obtenidos por la presente invención están de acuerdo con los obtenidos por otros autores que afirman que la transformación de los grupos amino de las poliaminas espermina y espermidina en grupos guanidinio mejora la estabilidad y unión a DNA [Pallan PS, Ganesh KN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; **222**: 416-420] y que el uso de un grupo guanidinio como la parte polar en formulaciones lipídicas conduce a vectores de transferencia génica satisfactorios [Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergley L, Bradley JC, Basseville M, Lehn P, Lehn J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **93**: 9682-9686].

Además, el péptido de la invención presenta una estructura helicoidal optimizada, lo que unido a la colocación de restos de aminoácidos básicos, que proporcionan grupos catiónicos, en ambos extremos del péptido, incrementa la capacidad de unión del mismo a polinucleótidos.

Como consecuencia de lo anterior, el péptido de la invención, en particular, el péptido RAWA, muestra una importante fracción helicoidal y una mejora en los niveles de condensación de polinucleótidos comparado con otros péptidos que no tienen las características innovadoras presentes en el péptido de la invención. Merece la pena destacar que los niveles de condensación inducidos por el péptido de la invención están situados dentro del intervalo definido para las protaminas, lo que puede relacionarse con una adecuada disociación del polinucleótido en el núcleo. Inesperadamente, la máxima condensación se alcanza a una relación de carga CR (+/-) de 4,0, y se asocia a la formación de oligómeros del péptido unido al polinucleótido. La existencia de este proceso de agregación, común en equilibrios de partición de péptidos antipáticos entre fases acuosas y membranas [White SH, Wimley WC, Ladokhin AS, Hristova K. *Methods Enzymol* 1998; **295**: 62-87] es compatible con la alteración liposomal disminuida y con la capacidad de incorporación del péptido aniónico JTS-1 presentada por los peptiplexes a CR (+/-) 4,0 en comparación con aquéllos a CR

1,0.

Capacidad de transporte funcional del vector no viral de la invención

La unión del péptido a la membrana celular y el transporte del material genético a través de la misma son limitaciones críticas en una transferencia génica eficiente. Para acceder al interior de la célula, se requiere, en general, la existencia de una actividad perturbadora de la membrana plasmática con el fin de poder disminuir la posibilidad de degradación del vector de transferencia por la vía lisosomal. Sin embargo, la alteración de la membrana puede conllevar, eventualmente, toxicidad celular. Por tanto, es esencial efectuar una cuidadosa evaluación de esta propiedad para proporcionar las características deseadas evitando de ese modo los indeseados efectos secundarios.

Los péptidos catiónicos, anfipáticos, helicoidales son estructuras clásicas con una capacidad de unión y de alteración de membrana bien conocidas. El grado de la alteración de la membrana depende de varios de factores que incluye el balance hidrófilo/hidrófobo, la longitud de la hélice y la presencia de residuos en determinadas posiciones, como el triptófano en la primera vuelta de la hélice, que impone restricciones en la orientación [Braun P, and von Heijne G. *Biochemistry*. 1999; **38**: 9778-9782]. Teniendo en cuenta todos estos factores en el diseño del péptido de la invención, en particular, del péptido RAWA, se ha logrado disminuir el daño en la membrana y la citotoxicidad del vector de la invención, que son características que limitan la aplicación de los sistemas de transferencia génica. La unión a la célula de los peptiplexes requiere una carga neta positiva y presumiblemente tiene lugar a través de la interacción con proteoglicanos aniónicos de la superficie celular tal como está descrito para algunos virus y otros vectores catiónicos no virales [Summerford C, Samulski R.J. *J. Virol.* 1998; **72**: 1438-1445; Mounkes LC, Zhong W, Cipres-Palacin G, Heath TD, Debs RJ. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 26164-26170]. Sin embargo, mientras que el complejo péptido-polinucleótido (peptiplex) presenta propiedades de unión a la célula, la capacidad de alteración de la membrana es inherente al péptido de la invención en estado libre. Así, por debajo de un cierto umbral de péptido libre, los peptiplexes siguen la vía de endocitosis y la expresión final del gen es dependiente de la adición de agentes endosomolíticos tales como la cloroquina. Sin embargo, por encima de ciertos niveles de concentración de péptido libre, determinados por estequiometría péptido a polinucleótido, el péptido de la invención altera la permeabilidad de la membrana, probablemente plasmática y facilita la entrada del peptiplex independientemente de la presencia de cloroquina.

El tamaño del transportador del polinucleótido determina la farmacocinética del peptiplex y es, por tanto, otro importante factor a considerar. La mayoría de los vectores disponibles comercialmente están basados en estructuras grandes. El uso de estructuras covalentes pequeñas y bien definidas, tales como los péptidos, puede facilitar el proceso de producción de vectores de transferencia génica y la formación y caracterización

de peptiplexes. Los péptidos anfipáticos exhiben propiedades de auto-agregación que dependen básicamente de la concentración del péptido y de las condiciones del medio ambiente tales como el pH, la fuerza iónica y la temperatura, que pueden dificultar la definición molecular del sistema o al menos requerir para tal definición condiciones alejadas a las empleadas en cultivos celulares. Los resultados obtenidos en la presente invención con el péptido RAWA demuestran la existencia de formas oligoméricas de dicho péptido en los peptiplexes. Sin embargo, la supuesta presencia de estas formas bajo las condiciones experimentales para la transferencia génica no constituye una limitación, ya que se observan unos altos niveles de eficacia en la transferencia de genes al no presentar una inhibición significativa por componentes del suero. De hecho, la inhibición por suero usualmente se relaciona normalmente con la formación de grandes agregados como resultado de la neutralización de los complejos con componentes del suero [Yang P, Huang L. *Gene Ther.* 1997; **4**: 950-960].

La presencia de oligómeros del péptido RAWA en el peptiplex permite considerar la posibilidad de incluir un péptido fusogénico y aprovechar sus propiedades para aumentar la eficacia global del proceso de transferencia funcional de genes. En una realización particular, el péptido fusogénico JTS-1 [Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SL, et al. *Gene Ther.* 1996; **3**: 448-457], un péptido anfipático, con estructura helicoidal, se incorporó a los complejos RAWA-polinucleótido (Ejemplo 7) para obtener un complejo ternario con la capacidad intrínseca de alterar la membrana, lo que abre la posibilidad de adaptar este sistema para la terapia génica *in vivo*. Como era de esperar, el péptido JTS-1 se incorporó a la superficie externa del peptiplex a través de la interacción con el péptido RAWA que le confiere una eficiente capacidad de transferencia de polinucleótido en unas condiciones de estequiometría que, todavía, preservan la carga global positiva necesaria para la unión a la célula.

El vector de la invención presenta numerosas aplicaciones relacionadas con el transporte de polinucleótidos al interior celular, tanto en investigación básica o aplicada (transfecciones) como en Biomedicina (terapia génica).

A modo de resumen, la invención proporciona un sistema de transporte de genes mejorado, en concreto, un vector no viral de transferencia génica, basado en un péptido catiónico, anfipático, con una capacidad mejorada de condensación de polinucleótidos y una citotoxicidad reducida, pero que mantiene, las actividades de unión y perturbación de membranas biológicas. La eficiencia observada con el péptido de la invención, en particular con el péptido RAWA es muy alta y comparable favorablemente con otros sistemas de transferencia génica bien reconocidos. De hecho, parece ser que es la primera vez que un vector de transferencia génica basado en un péptido alcanza ese nivel. La ausencia de inhibición sérica y, la baja toxicidad colocan al vector de la invención en una situación ventajosa para su aplicación *in vivo*. La introducción adicional de

secuencias peptídicas simples destinadas a proporcionar especificidad celular, tales como la secuencia de reconocimiento de la integrina [Harbottle RP, Cooper RG, Hart SL, Ladhoff A, McKay T, Knight AM, et al. *Hum. Gene Ther.* 1998; 9: 1037-1047], podría extender la aplicabilidad de este nuevo vector.

Célula

En otro aspecto, la invención proporciona una célula transformada que comprende un vector de la invención. En una realización particular, dicha célula es una célula eucariótica, preferentemente, de mamífero.

Composición

La invención también proporciona una composición, en adelante, composición de la invención, que comprende un vector de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más agentes seleccionados entre agentes que enmascaran al polinucleótido, agentes de reconocimiento de células, agentes de permeabilización de membranas biológicas, agentes de localización subcelular, y sus mezclas, aún cuando parte de estas actividades estén ya contempladas en el vector.

Los agentes que enmascaran al polinucleótido son unos compuestos químicos, por ejemplo, polietilenglicol, lípidos, etc., que enmascaran la totalidad o parte de un polinucleótido con el fin de aumentar su vida media en el torrente circulatorio inhibiendo el ataque de productos degradadores tales como las nucleasas presentes en el sistema circulatorio y/o que interfieren con su captación por el retículo endoplasmático.

Los agentes de reconocimiento de células son unas moléculas, por ejemplo, anticuerpos frente a antígenos de superficie celular, ligandos para receptores de superficie celular, hormonas peptídicas, etc., capaces de reconocer un componente presente en la superficie de una célula diana.

Los agentes de permeabilización de membranas biológicas son unos compuestos que ayudan al polinucleótido a pasar una membrana biológica e incluyen a compuestos que neutralizan la carga del polinucleótido y permiten al polinucleótido atravesar el interior hidrófobo de la membrana, así como compuestos anfipáticos, péptidos, glicolípidos, fosfolípidos, sales biliares y detergentes. Aunque, el vector de la invención tiene una buena capacidad para transportar el polinucleótido al interior de la célula a través de la membrana, lo que puede hacer innecesaria la adición de agentes de permeabilización de membrana adicionales, en ocasiones, si se desea, la composición de la invención puede contener otros agentes de permeabilización que coadyuven al péptido de la invención en la perturbación de la membrana.

Los agentes de localización subcelular son unos compuestos, generalmente, secuencias peptídicas pequeñas, capaces de reconocer un componente subcelular, por ejemplo, núcleo, ribosomas, lisosomas, mitocondrias, etc., en una célula diana.

Ejemplos representativos de agentes que enmascaran al polinucleótido, agentes de reconocimiento de células, agentes de permeabilización de membranas biológicas y agentes de localización subcelular pueden encontrarse en la patente norteamericana US 5.990.089.

Composición farmacéutica

La invención también proporciona una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un vector de la invención, o una composición de la invención, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El vector o composición de la invención, para aplicaciones terapéuticas puede ser formulado de múltiples maneras, en una forma de administración adecuada para su administración por cualquier vía apropiada, incluyendo, la vía oral, parenteral o tópica. Una revisión de las distintas formas de administración de fármacos y de los excipientes para su elaboración puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, de C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1ª edición, 1993.

Procedimiento para la introducción de un polinucleótido en una célula

El vector de la invención, o una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención pueden ser empleados para la introducción de un polinucleótido en una célula. La célula, preferentemente, será una célula eucariótica, más preferentemente, una célula de mamífero, incluyendo células de seres humanos. La introducción del polinucleótido en la célula puede realizarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para la introducción *in vitro* de un polinucleótido en una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un vector de la invención, o una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma. Salvo indicación en sentido contrario, el DNA utilizado en todos los ejemplos para ensayar la capacidad del péptido de la invención para unir y condensar DNA, así como para transferirlo al interior celular, fue DNA plasmídico (pSV2LUC).

Ejemplo 1

Síntesis de péptidos

Los péptidos RAWA [SEC. ID. N°: 1], KALA [Wyman TB, Nicol F, Zelphati O, Scaria PV, Plank C, Szoka FC Jr. *Biochemistry* 1997; 36: 3008-3017] y JTS-1 [Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SL, et al. *Gene Ther.* 1996; 3: 448-457] se obtuvieron por síntesis química en un sintetizador automático múltiple AMS 422 (Abimed) empleando la metodología convencional de síntesis en fase sólida con química Fmoc estándar [Gausepohl H, Boulin C, Kraft M, Frank RW. *Pept. Res.* 1992; 5: 315-320; King DS, Fields CG, Fields GB. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1990; 36: 255-266]. A continuación, los péptidos se purificaron del crudo de reacción mediante HPLC empleando una columna semipreparativa Nucleosy C-18 (Tracer). La homogeneidad e integridad de los productos purificados se confirmó mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas.

El péptido RAWA es soluble en una solución acuosa y presenta una estructura helicoidal de aproximadamente un 40 %, de acuerdo con su es-

pectro de dicroísmo circular (CD) a 25°C [Padmanabhan S, Zhang W, Capp MW, Anderson, CF, Record MT Jr. *Biochemistry* 1997, 36: 5193-5206].

Ejemplo 2

Determinación de la unión de DNA al péptido RAWA por electroforesis

Se ha evaluado la unión del péptido RAWA a DNA por electroforesis, mediante el retardo electroforético del plásmido pSV2LUC en geles de agarosa al 1%. Para ello, una cantidad fija de DNA se hizo interaccionar con cantidades crecientes del péptido RAWA a unas relaciones molares de carga "fosfato (DNA):resto catiónico (péptido)" [CR (-/+)] preestablecidas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1A donde puede apreciarse que la banda correspondiente al plásmido libre va desapareciendo a medida que se incrementa la cantidad del péptido, desapareciendo completamente cuando la CR llega a 1 (complejo electroneutro). Por otra parte, la ausencia de tinción por el colorante bromuro de etidio de la banda de DNA retenida en el pocillo por la interacción con el péptido denota un cierto nivel de compactación. No obstante, este primer estudio no permitió una discriminación adicional frente al nivel de interacción requiriéndose un análisis más detallado.

Ejemplo 3

Determinación de la unión y condensación de DNA por fluorescencia

Se ha determinado la unión de los péptidos RAWA y KALA a DNA, así como la condensación del DNA por dichos péptidos mediante ensayos de fluorescencia basados en la extinción de la fluorescencia del triptófano de los péptidos y en el desplazamiento del bromuro de etidio, previamente intercalado en el ácido nucleico. Las Figuras 1B y 1C muestran los perfiles de unión a DNA de los péptidos RAWA y KALA obtenidos en los ensayos de extinción de fluorescencia de triptófano y desplazamiento del bromuro de etidio, respectivamente.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro SLM-Aminco 8100 (Urbana, IL) a 37°C, utilizando una configuración de polarizadores en ángulo mágico. La unión del péptido al DNA (pSV2LUC) se siguió mediante la extinción de la fluorescencia del triptófano, utilizando 296 nm y 350 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente [Padmanabhan S, Zhang W, Capp MW, Anderson, CF, Record MT Jr. *Biochemistry* 1997, 36: 5193-5206]. Las soluciones peptídicas (3-5 μ M) se valoraron mediante adiciones sucesivas de un plásmido de DNA (pSV2LUC). La extinción de la fluorescencia observada (Q_{obs}) se calculó como $(F-F_o)/F_o$, donde F es la intensidad de la fluorescencia observada en presencia de DNA y F_o es la intensidad de la fluorescencia del péptido libre.

El desplazamiento del bromuro de etidio (EtBr) se determinó midiendo la reducción de la emisión de fluorescencia a 595 nm (excitación a 510 nm) de una solución de DNA plasmídico (30 μ M de fosfato-DNA) marcado con el agente intercalante (relación molar DNA:EtBr de 29:1) por adición de cantidades crecientes de los péptidos RAWA y KALA [Wyman TB, Nicol F, Zelphati

O, Scaria PV, Plank C, Szoka FC Jr. *Biochemistry* 1997; 36: 3008-3017]. El desplazamiento del bromuro de etidio se calculó como $(F-F_f)/(F_b-F_f)$ donde F es la intensidad de la fluorescencia observada en presencia de DNA y F_f y F_b son las intensidades de la fluorescencia del EtBr en ausencia y presencia de DNA, respectivamente.

La unión del péptido RAWA al DNA, determinada mediante el ensayo de extinción de fluorescencia del triptófano, es bifásica. La extensión del "apagamiento" (extinción) se incrementa bruscamente hasta un máximo a una CR (-/+) de 0,25, decreciendo hasta alcanzar una meseta a una CR (-/+) de 1,0. Estos datos son compatibles con un proceso complejo en el que existen dos formas de péptido unido al DNA, agregados a bajos valores de CR (-/+) y monómeros a valores de CR (-/+) superiores a 1,0. Por el contrario, la extensión del apagamiento de la fluorescencia del triptófano en el péptido KALA se incrementa monóticamente hasta alcanzar el máximo a una CR de 1:1, lo que está en consonancia con una única estructura interactuante del péptido con el DNA.

El ensayo de desplazamiento del bromuro de etidio (Figura 1C) revela que el máximo de condensación del DNA inducido por el péptido RAWA se alcanza a un nivel de CR (+/-) de 4,0, de conformidad con los resultados previos, y que la fracción de desplazamiento del colorante es similar a la observada con protamina (datos no presentados). El péptido KALA alcanza un máximo de condensación en el complejo teórico de carga electroneutro, y tanto la tendencia como el grado de exclusión concuerdan con los valores descritos [Wyman TB, Nicol F, Zelphati O, Scaria PV, Plank C, Szoka FC Jr. *Biochemistry* 1997; 36: 3008-3017]. Tomados en su conjunto, estos resultados revelan que el péptido RAWA tiene un mejor efecto en la condensación de DNA y que su interacción con el DNA implica formas monoméricas y agregadas.

Ejemplo 4

Capacidad perturbadora de membrana

La capacidad de los péptidos (RAWA y KALA) libres de DNA de interaccionar y perturbar membranas biológicas se determinó mediante ensayos con liposomas formados por fosfolípidos neutros (fosfatidilcolina) y aniónicos (fosfatidilglicerol) estudiando el efecto sobre la permeabilidad de las membranas y la capacidad de promover la mezcla de lípidos (Figura 2). En un primer ensayo se evaluó su actividad fusogénica cuantificando la mezcla de lípidos tras la fusión de liposomas marcados con un doble fluoróforo y liposomas sin marcar (Figura 2A). Paralelamente se estudió la capacidad de dichos péptidos para desestabilizar liposomas y permitir la fuga de su contenido fluorogénico (Figura 2B).

Para realizar este ejemplo se prepararon unas vesículas lipídicas (POPC:POPG, 70:30) de 100 nm de diámetro mediante hidratación-extrusión en tampón Hepes 25 mM pH 7,0, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM. Para los ensayos de mezcla de lípidos, las vesículas se marcaron con 1% de NBD-PE y 0,6% Rh-PE, y se diluyeron en una relación 1:9 con vesículas no marcadas. Para los ensayos de permeabilidad, la hidratación se realizó en tampón Hepes 25 mM pH 7,0, NaCl 20

mM, ANTS 12,5 mM, DPX 45 mM y EDTA 1 mM. Tras la extrusión, el material extravesicular se separó mediante cromatografía empleando una columna de Sephadex G75 equilibrada en tampón Hepes 25 mM pH 7,0, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM, y la concentración final de lípido se determinó mediante valoración del contenido en fosfato [Barlett GR, *J. Biol. Chem.* 1959, 234:466]. La liberación del contenido intravesicular y la mezcla de lípidos se determinó de acuerdo con metodología estándar [Mancheño JM, Gasset M, Albar JP, Lacadena J, Martínez del Pozo A, Oñaderra M, Gavilanes JG, *Bipphys. J.* 1995, 68: 2387-2395; Ellens H, Bentz J, Szoka FC Jr, *Biochemistry*, 1984, 23:1532-1538; Struck DK, Hoekstra D, Pagano, *Biochemistry*, 1981, 20:4093-4099], efectuando las medidas después de 30 minutos de interacción péptido-lípido a 37°C. La mezcla de lípidos se calculó como el incremento relativo de la intensidad de fluorescencia a 530 nm (excitación a 470 nm), siendo F_0 and F_{100} los valores de la intensidad en ausencia de péptidos y en presencia de 0,5 % Triton X-100 (v/v), respectivamente. Análogamente, el porcentaje de permeabilización se calculó como el incremento relativo de la intensidad de fluorescencia a 530 nm (excitación a 386 nm), siendo F_0 and F_{100} los valores de la intensidad en ausencia de péptidos y en presencia de 0,5 % Triton X-100 (v/v), respectivamente.

Tal como se indicó, el péptido KALA tiene una acción perturbadora de la membrana de tal forma que le hace competente para la mezcla de lípidos (capacidad fusogénica) a niveles de relaciones péptido/lípido mayores que los observados en el ensayo de actividad lítica (Figura 2A). Por el contrario, el péptido RAWA carece de potencial fusogénico y, la actividad máxima lítica requiere una mayor relación péptido/lípido que el péptido KALA. Ambos resultados indican que el péptido RAWA actúa como una secuencia formadora de poros transmembrana y con interferencia de especies agregadas en solución acuosa [Brasseur R. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:16120-16127; Rapaport D, Peled R, Nir S, Shai Y. *Bipphys. J.* 1996; 70:2503-2512].

La adición secuencial de DNA a una cantidad fija de péptido previene la acción desestabilizante de membrana de forma CR-dependiente. La magnitud de este efecto se correlaciona con la formación de un complejo péptido/DNA con un CR de 1:1 (Figura 2C). De acuerdo con la menor capacidad de alteración de membrana del péptido RAWA en comparación con KALA, se puede postular una menor toxicidad para RAWA, que permitiría su uso como un sistema de transferencia de DNA ya sea en cultivos celulares o *in vivo*. Ejemplo 5

Transferencia de DNA

Una vez establecido que el péptido RAWA presenta la capacidad de transferir DNA *in vitro*, se evaluó el potencial del péptido RAWA como vector de transferencia génica mediante ensayos de transfección en células COS-7.

Se realizaron unos ensayos convencionales de transfección en células COS-7 transformadas con SV40, mantenidas en cultivo en medio Eagle modificado por Dulbecco (BioWhittaker, Inc.), conteniendo 10 % de suero fetal bovino térmicamente

inactivado L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin. Las células se incubaron con peptiplexes, es decir, complejos péptido/DNA [Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L., et al. *Hum. Gene Ther.* 1997; 8: 511-512], preformados utilizando una cantidad fija del plásmido pSV2LUC (2 μg) y cantidades crecientes del péptido a ensayar, y se determinó la CR de estos complejos. El plásmido de expresión pSV2LUC incluye el gen de la luciferasa bajo el control del promotor temprano de SV40.

Los complejos péptido/DNA (peptiplexes) se prepararon incubando 2 μg de DNA plasmídico (pSV2LUC) con cantidades variables de cada péptido en tampón Hepes 50 mM pH 7,5, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para los ensayos de transfección, las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, cultivándose durante toda la noche a 37°C. El medio de crecimiento se cambió con 1 ml/pocillo de medio fresco 30 minutos antes de añadir los complejos péptido-DNA (100 μl /pocillo). Las células se incubaron durante 16 h a 37°C con los peptiplexes y, después de un cambio de medio, 24 la más, antes de su recolección para el análisis. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La actividad luciferasa se determinó empleando la metodología convencional [Fominaya J, Wels W. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 10560-10568], utilizando 150 μl de lisado y 5 μl de muestra de ensayo. La actividad enzimática se siguió durante 10 segundos en un luminómetro (LUMAT LB 9501, Berthold) con inyecciones automáticas de 100 μl de luciferina (Sigma) 250 mM, glicilglicina 25 mM, pH 7,8 y coenzima A (Boehringer Mannheim) 0,5 mM. La actividad luciferasa se calculó como unidades relativas de luz por mg de proteína celular total (URL/mg).

Debido a que la unión de los complejos péptido/DNA a las células va a depender de la carga neta positiva, en un primer experimento se procedió a determinar el efecto de la estequiometría del complejo sobre la actividad del transgen. La Figura 3A muestra los niveles de citotoxicidad, expresados en forma de porcentaje de viabilidad de células COS-7 transfectadas con dichos complejos, a diferentes CR (como valor de referencia de 100 % de viabilidad se usaron células tratadas con un placebo).

La eficacia del péptido RAWA como vector de transferencia de DNA en comparación con el péptido control (KALA) se muestra en la Figura 3B, donde puede apreciarse que el péptido RAWA fue ocho veces más eficiente que el péptido KALA y con una menor toxicidad, permitiendo la transferencia génica sin toxicidad en una concentración de péptido que en el caso de ser KALA causaría una extensa muerte celular.

Con objeto de discriminar entre una captación natural de los peptiplexes (DNA-RAWA) por las células y una efectiva introducción del gen reportero, se realizaron una serie de ensayos de transfección, solos o en presencia de cloroquina (Figura 4A), un reactivo acidotrópico que neutraliza el pH endosomal e induce un hinchamiento osmótico de las vesículas que permite la liberación del conte-

nido endosomal al citoplasma en ausencia de actividad de translocación [Wolfert MA, Seymour LW. *Gene Ther.* 1998; 5: 409-414]. Se observó que los complejos de DNA-RAWA eran capaces de unirse a las membranas celulares y alcanzar el endosoma en todos los niveles de CR estudiados. Sin embargo, a bajos niveles de CR (+/-) la cloroquina es esencial para una transferencia génica exitosa. A altos niveles de CR, los complejos DNA-RAWA actúan de forma independiente de aditivo y ofrecen eficiencias que se incrementan en paralelo con la cantidad total de péptido. Esto demuestra que los complejos péptido/DNA son eficaces en cuanto a la unión celular y el transporte inicial del DNA al interior celular pero los complejos a bajas estequiometrías (CR (+/-)) son incapaces de alcanzar el citosol y quedan retenidos en endosomas. Este comportamiento sugiere la existencia de al menos dos formas peptídicas, cada una de ellas responsable de una actividad diferente. Una explicación es que el péptido del peptiplex puede mediar la unión de complejos a la membrana celular, mientras que el péptido libre pudiera modificar la permeabilidad de la membrana. Esta hipótesis se confirmó analizando el efecto de la adición del péptido libre a las células incubadas con peptiplexes en una relación CR (+/-) de 2 en ausencia (control negativo) y en presencia (control positivo) de cloroquina en comparación con peptiplexes preparados a niveles elevados de CR (+/-) de 20. La adición del péptido libre RAWA a las células tratadas con peptiplexes a bajos niveles de CR provocó mayores niveles de luciferasa que los observados en los controles con tratamiento con cloroquina y peptiplex CR (+/-) de 20 (Figura 4B), es decir, que el péptido libre RAWA añadido es capaz de reconstituir la eficacia obtenida con el tratamiento con cloroquina. Los menores niveles de luciferasa obtenidos con peptiplex a niveles de CR 20 pueden estar justificados por el menor contenido de la forma libre del péptido RAWA, ya que el material añadido a las células es compartido entre los complejos péptido-DNA y el péptido libre. Los estudios de interacción DNA-péptido (Figura 1) apuntan a una estequiometría de péptido unido de CR (+/-) de 4, que dejaría únicamente el 80 % del total del péptido RAWA como péptido libre en el complejo péptido-DNA con una CR de 20. Todos los ensayos de transfección fueron realizados en presencia de niveles normales de suero al no mostrar el péptido RAWA inhibición por el suero, que representa una limitación en otros sistemas de transferencia génica.

Para evaluar la dependencia de la concentración de los complejos péptido/DNA en la eficacia de transfección se prepararon complejos a una relación molar de carga (CR) de 4 utilizando cantidades de DNA variables comprendidas entre 0,2 y 6 μg (Figura 5). La Figura 5A describe el efecto de cantidades crecientes de DNA plasmídico en un sistema de transferencia génica mediado por el péptido RAWA. Inesperadamente, las correlación lineal entre la dosis de DNA y la actividad del transgen se observa únicamente en un estrecho intervalo de 0,2 a 0,5 μg de plásmido. Por encima de este valor, ocurre un efecto de saturación y no se observan otros incrementos adicio-

nales. Esto permite reducir cuatro veces la dosis de DNA usada en los métodos rutinarios utilizados sin pérdida apreciable de rendimiento. Cuando los experimentos de titulación (Figura 4A) fueron repetidos con 0,5 μg de DNA plasmídico (Figura 5B), se obtuvo un perfil distinto, en el que la actividad dependiente de cloroquina ya no es constante alcanzando un nivel máximo en un intervalo de CR (+/-) entre 4 y 8, indicando una estequiometría de péptido unido en el complejo de 4, resultado que está en sintonía con los datos biofísicos. Además, la actividad independiente de cloroquina aparece ahora a una CR de 64, es decir, 4 veces superior a la observada en la Figura 4. Esto confirma el efecto perturbador de membranas ejercido por el péptido libre, pues en las condiciones mencionadas la concentración de péptido total (y en ese caso, es mayoritariamente péptido libre) es idéntica a la utilizada para una CR de 16 en la titulación con 2 μg de DNA. Sin embargo, en ambos casos la concentración total del péptido, principalmente el péptido libre RAWA, es equivalente.

Ejemplo 6

Potencial del péptido RAWA como sistema de transferencia génica

El péptido RAWA ofrece resultados similares a los obtenidos con la mayoría de los mejores agentes de transferencia génica, comercialmente disponibles, ya sea cuando se usan a niveles de CR (+/-) de 4,0 en presencia de cloroquina (Figura 6A) y en niveles de CR (+/-) de 16,0 en ausencia de aditivos (datos no presentados). La eficiencia de un vector basado en el péptido RAWA en células COS-7 es similar a la obtenida con Lipofectamine Plus[®] (Gibco-Life Technologies), Superfect[®] (Quiagen), GenePorter[®] (Gene Delivery Systems) o FuGene[®] (Boehringer Mannheim, Ind) (Figura 6A). En análisis de citometría de flujo se estimaron al menos un 60 % de células positivas con este sistema usando como gen indicador el gen que codifica la proteína fluorescete verde (datos no mostrados). La Figura 6B muestra un estudio comparativo para evaluar la eficiencia del péptido RAWA sobre distintas líneas celulares, utilizando Lipofectamine Plus[®] como control interno. El efecto del contexto celular sobre la eficacia de transfección se evaluó utilizando las siguientes líneas celulares: fibroblastos de ratón, NIH-3T3; células embrionarias de riñón humano transformadas con E1A, 293; células embrionarias de riñón humano transformadas con E1A y SV 40, 293T; células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7; células de fibrosarcoma humano HT-1080; células adenocarcinoma humano HeLa; osteosarcoma canino D17; células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC); células del cordón umbilical humano ECV304; y células de melanoma de ratón B16. Los peptiplexes y los ensayos de luciferasa se prepararon de acuerdo a lo descrito en el Ejemplo 5.

Se observó que la eficiencia era altamente dependiente de las células diana, como en el caso de la mayoría de los sistemas de transferencia génica. Los mejores resultados con el péptido RAWA fueron obtenidos usando células adheridas (COS-

7, 293T, HT1080 y D17), y fueron pobres cuando se usaron células en suspensión, al igual que con otros vectores catiónicos de transferencia génica. Cuando se compara con Lipofectamine Plus[®], la eficiencia se encuentra generalmente en el mismo nivel. Con algunas líneas celulares, tales como D17, la actividad luciférasa dependiente del péptido RAWA superaba niveles de 10¹⁰ URL/mg de proteína.

Finalmente, durante los ensayos de transfección con RAWA la toxicidad celular es mínima y sólo comienza a apreciarse a CR muy elevadas (por encima de 32), lo que supone una concentración de péptido en el cultivo celular superior a 30 μ M (Figura 7). Las condiciones normales de trabajo son de 1 ó 2 μ M. La carencia de toxicidad unida a su buen funcionamiento en presencia de suero, dos de las limitaciones más frecuentes de los sistemas de transferencia génica, colocan al sistema basado en el péptido RAWA en una posición ventajosa.

Ejemplo 7

Aplicación in vivo del péptido RAWA

El péptido RAWA cumple todos los criterios requeridos a un vector génico en ensayos de transfección. Sin embargo, con la excepción de dudas farmacocinéticas, sus aplicaciones *in vivo* pueden ser limitadas debido a que requiere una fracción peptídica libre para poder ejercer una actividad perturbadora de membrana. Para superar esta limitación, se ha incorporado un péptido fusogénico al peptiplex basado en el péptido RAWA (Figura 7). Como entidad fusogénica a modo de ejemplo, se ha utilizado JTS-1, un péptido anfipático de naturaleza ácida optimizado a partir de la secuencia amino-terminal de la hemaglutina

de la influenza [Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SL, et al. *Gene Ther.* 1996; 3: 448-457]. Los experimentos de titulación revelaron que JTS-1 se une al peptiplex por interacción con el péptido RAWA. La preincubación de ambos péptidos antes de la adición del DNA elimina el efecto fusogénico obtenido cuando JTS-1 es añadido al peptiplex que comprende el péptido RAWA. Además, la actividad de dicho péptido fusogénico es mucho menor cuando se añade en forma *trans* o las células tratadas con los complejos RAWA-DNA. La estequiometría empleada en este experimento es el resultado de las valoraciones de JTS-1 y diferentes CR (+/-) de los complejos RAWA-DNA, en un intervalo de 3 a 8. En todos los casos, el máximo efecto fue observado en una CR (+/-) JTS-1/RAWA de 1:2 (datos no mostrados), lo que preserva la carga global positiva del complejo, y fue establecido como óptimo para futuros experimentos. Estos resultados sugieren que la eficiencia de la transferencia génica *in vivo* puede ser alcanzada con la incorporación de un segundo péptido al complejo como coadyuvante. Este complejo sandwich además subraya la posibilidad de péptidos modulares de fusión, cuya viabilidad podría ser apoyada por estudios previos de los inventores en relación con proteínas quiméricas multidomínios como vectores de transferencia génica [Fominaya J, Wels W. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 10560-10568; Wels W, Fominaya J. Peptides and fusion proteins as modular DNA carriers. En: A.V. Kabanov, P. Felgner, P. and L.W. Seymour (eds). *Self-assembling complexes for gene delivery: from laboratory to clinical trial.* John Wiley & Sons Ltd, 1998, pp.351-369].

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1.

2. Péptido según la reivindicación 1, que comprende dos o más secuencias de fórmula general (I) unidas entre sí, independientemente, de forma consecutiva o espaciadas por secuencias flexibles o ricas en prolina.

3. Péptido según la reivindicación 1, en el que los aminoácidos aa1 a aa23 son D-aminoácidos.

4. Un procedimiento para la obtención de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la síntesis química de dicho péptido.

5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Un procedimiento para la obtención de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la expresión en un sistema de expresión de una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 9.

7. Un vector no viral de transferencia génica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un polinucleótido acoplado no covalentemente a dicho péptido.

8. Vector según la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido es una molécula de DNA, monocatenaria, bicatenaria o multicatenaria, lineal o circular.

9. Vector según la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido es una molécula de RNA, monocatenaria, bicatenaria o multicatenaria, lineal o circular.

10. Vector según la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido es una molécula híbrida DNA-RNA.

11. Vector según la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido es una molécula híbrida PNA-DNA.

12. Vector según la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido se selecciona entre un polinucleótido que codifica regiones promotoras, operadoras, estructurales o terminadoras de genes, o una combinación de las mismas, un polinucleótido que codifica un material codificante o no, pero genéticamente relevante, y sus mezclas.

13. Vector según la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido comprende un ácido nucleico

con valor terapéutico.

14. Vector según la reivindicación 13, en el que dicho polinucleótido se selecciona entre un polinucleótido antisentido, un polinucleótido que codifica un producto con actividad enzimática, un producto que, una vez en la célula, modifique la fisiología celular o una situación patológica, y sus mezclas.

15. Vector según la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido forma parte de un cromosoma artificial.

16. Vector según la reivindicación 7, que comprende, además, un agente potenciador de la capacidad de alterar la membrana.

17. Vector según la reivindicación 16, en el que dicho agente potenciador de la capacidad de alterar la membrana es un péptido fusogénico.

18. Una célula que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17.

19. Célula según la reivindicación 18, **caracterizada** porque es una célula eucariótica.

20. Una composición que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, opcionalmente junto con uno o más agentes seleccionados entre agentes que enmascaran el polinucleótido, agentes de reconocimiento de células, agentes de permeabilización de membrana, agentes de localización subcelular, y sus mezclas.

21. Una composición farmacéutica que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, o una composición según la reivindicación 20, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

22. Un procedimiento para la introducción *in vitro* de un polinucleótido en una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un vector según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, o con una composición según la reivindicación 20, o con una composición farmacéutica según la reivindicación 21.

23. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la elaboración de un vector no viral de transferencia génica.

24. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de un vector de transferencia génica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, en la elaboración de una composición farmacéutica adecuada para terapia génica.

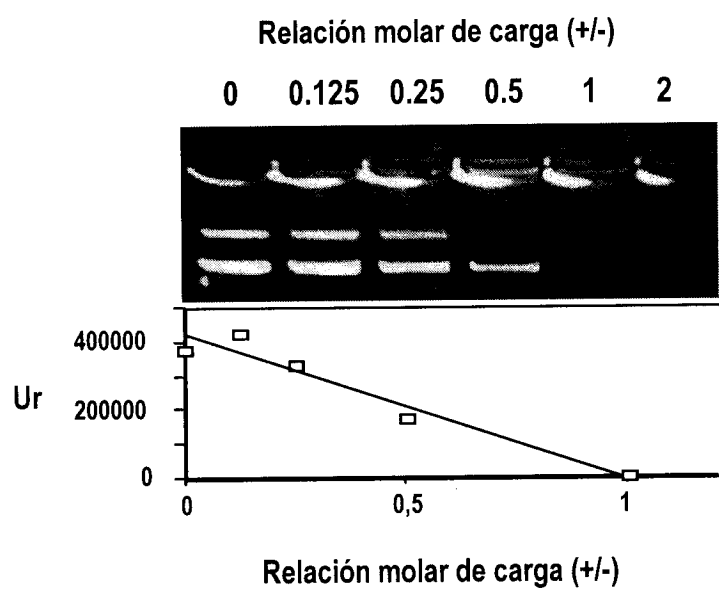


Figura 1 A

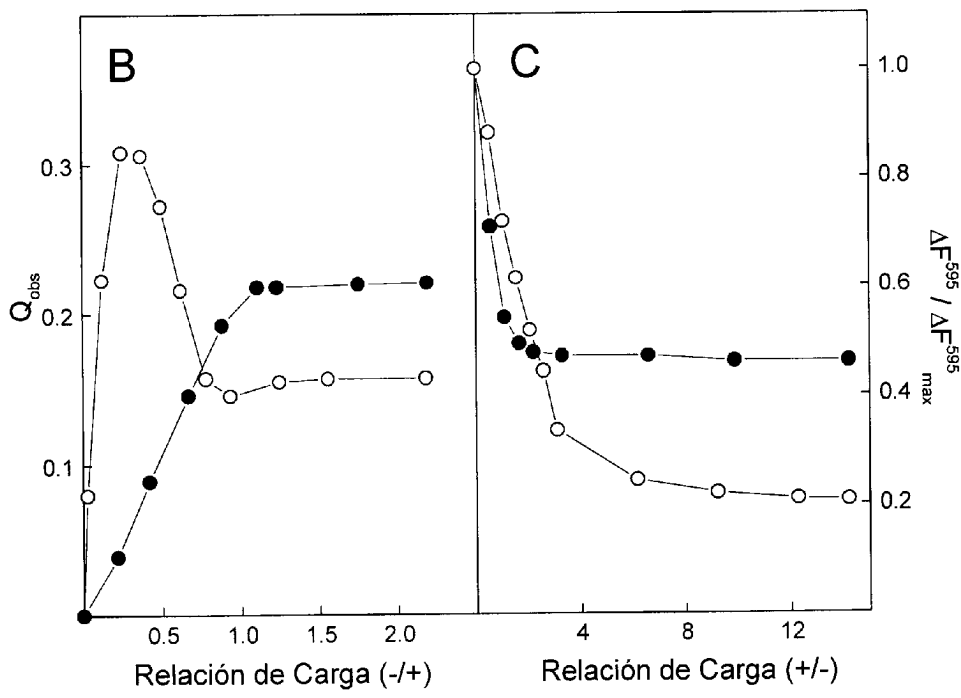


Figura 1 B

Figura 1 C

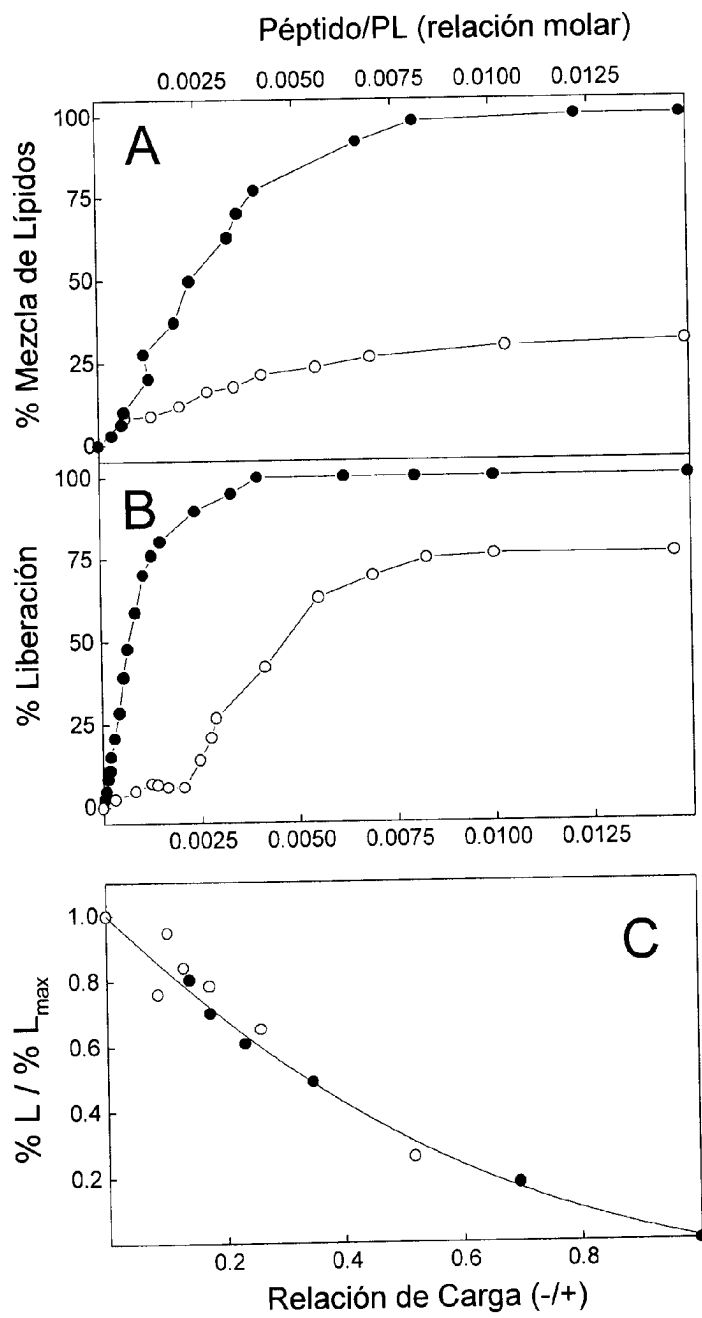


Figura 2

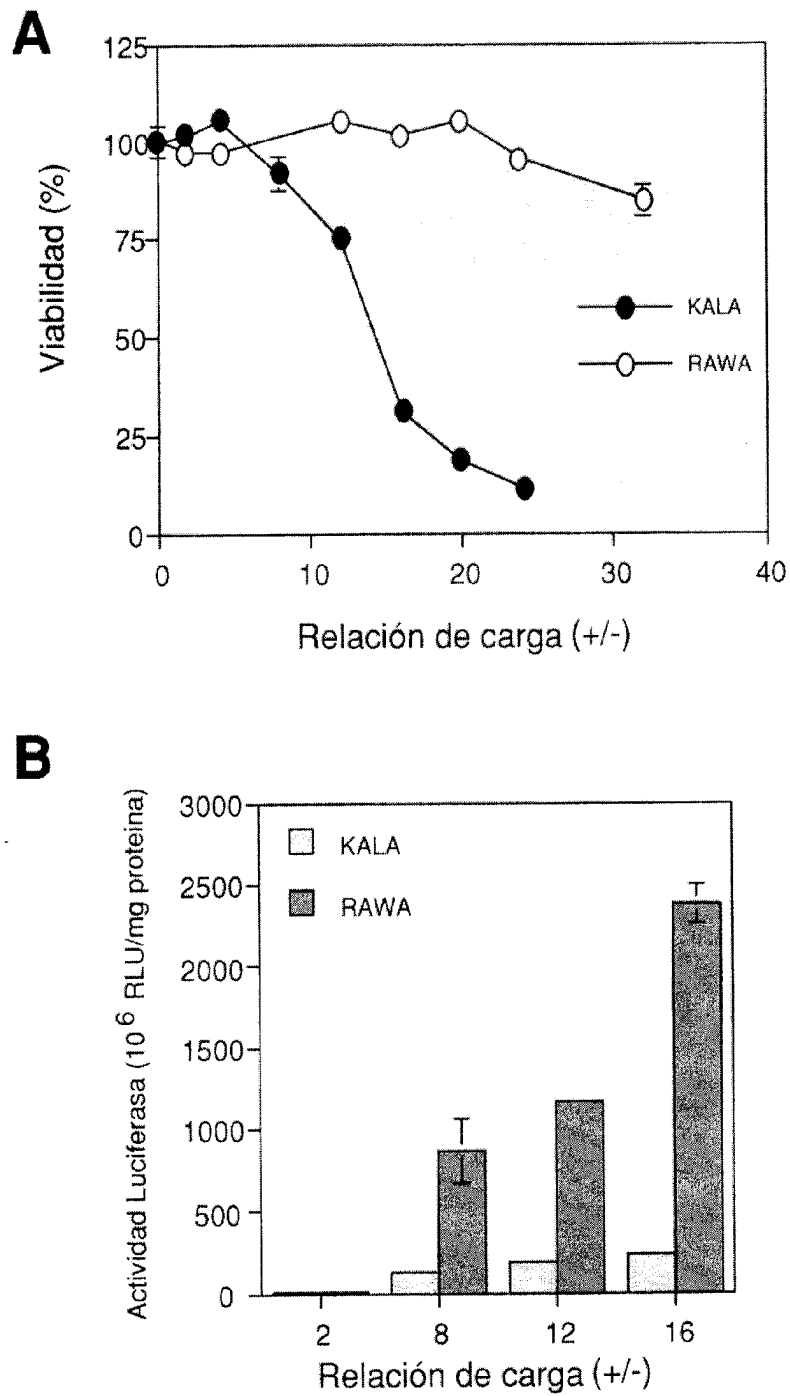


Figura 3

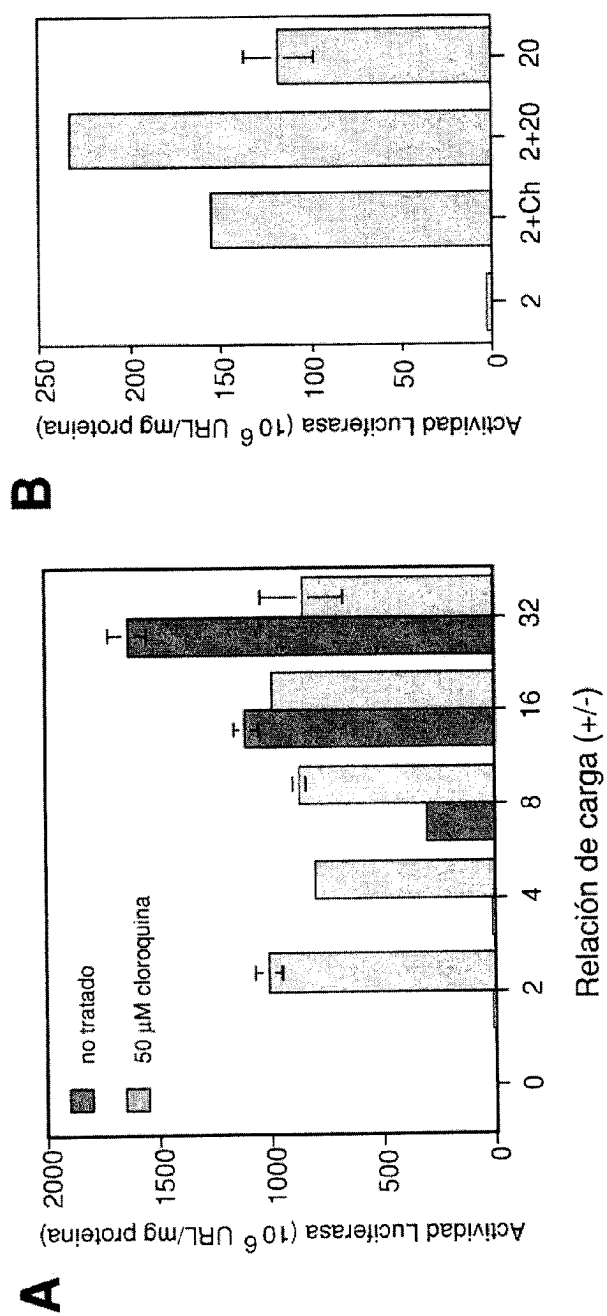


Figura 4

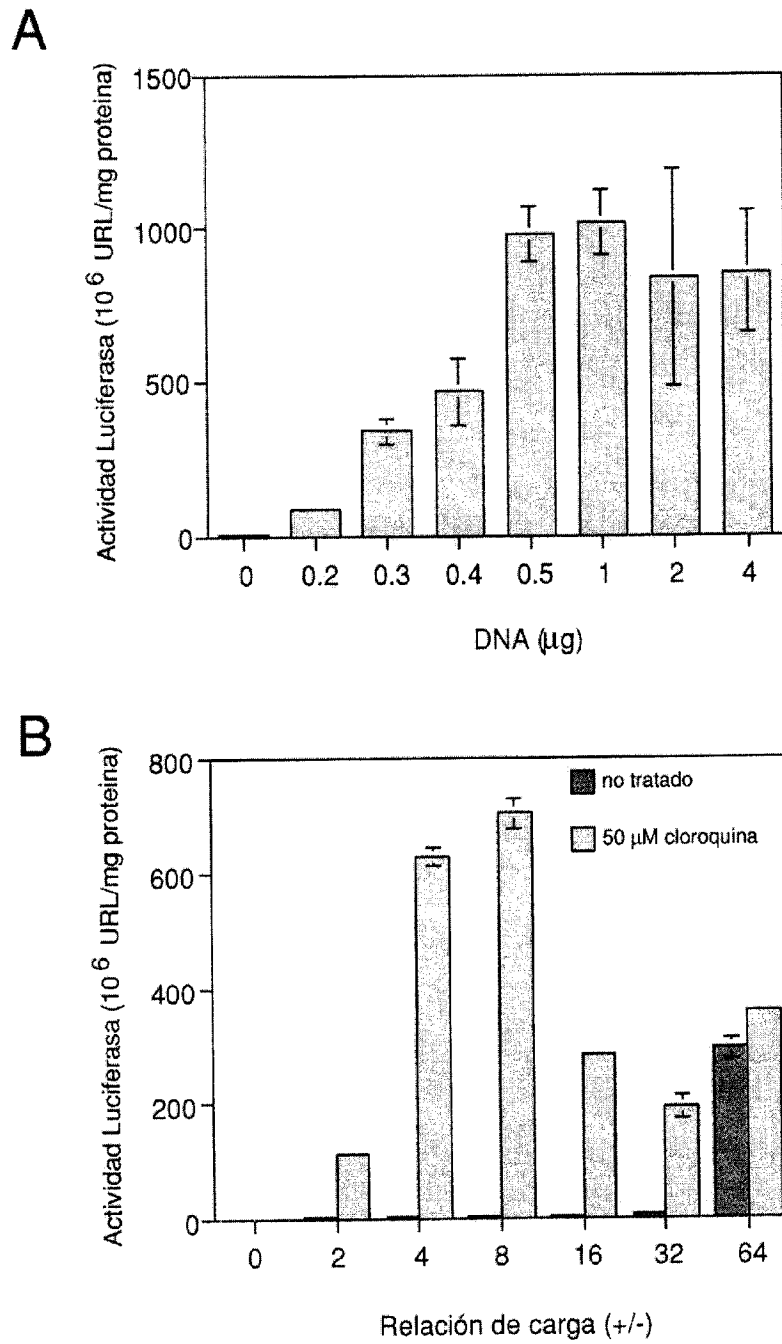
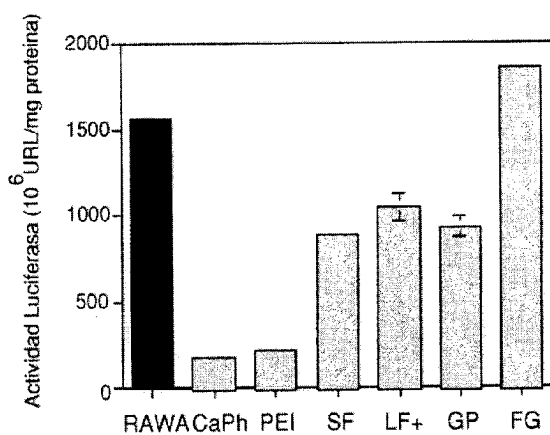


Figura 5

A



B

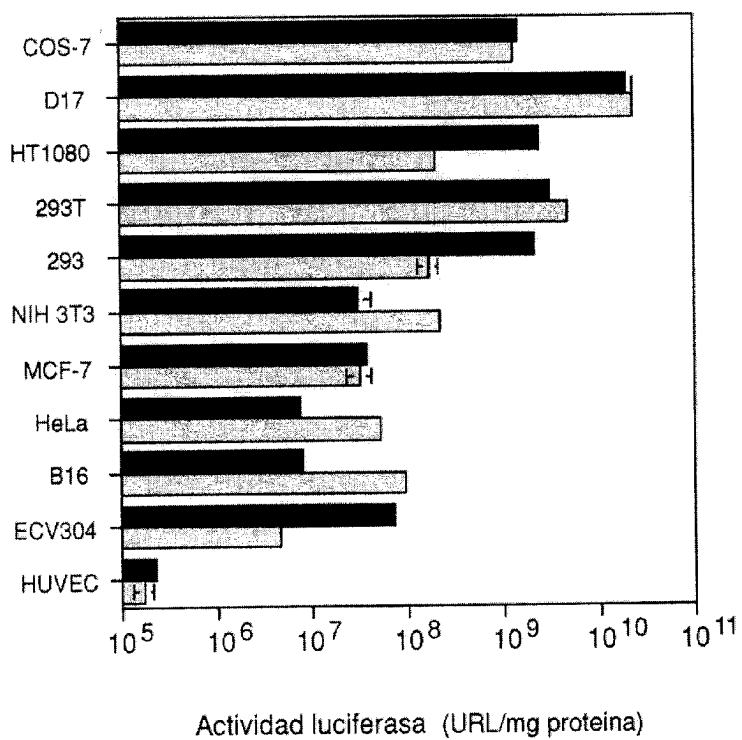


Figura 6

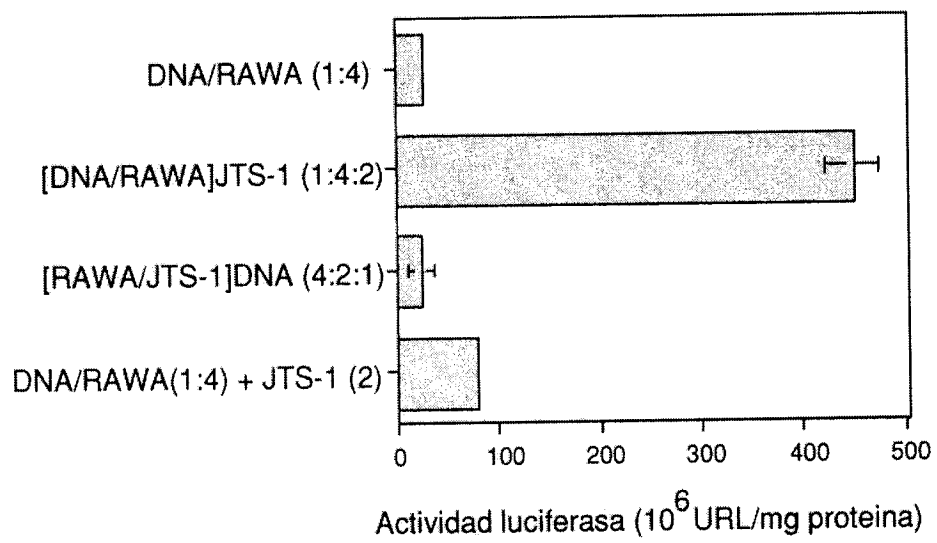


Figura 7

LISTAS DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL

- 5 (1) SOLICITANTE:
NOMBRE: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MEDPLANT GENETICS, S.L.
JESUS FOMINAYA GUTIERREZ
- 10 (2) CALLE: Serrano, 113
(3) CIUDAD: Madrid
(4) PROVINCIA: Madrid
(5) PAIS: España
15 (6) CODIGO POSTAL: 28006
(7) TELEFONO: 91 585 50 00
(8) TELEFAX: 91 411 30 77
- (2) TITULO DE LA INVENCION: PEPTIDOS CATIONICOS ANFIPATICOS Y
SU APLICACION EN VECTORES DE TRANSFERENCIA GENICA
- 20 (3) NUMERO DE SECUENCIAS: 1
(4) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
(1) TIPO DE SOPORTE: Floppy disk
25 (2) ORDENADOR: IBM PC compatible
(3) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(4) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (OPE)

(2) INFORMACION DE LA SECUENCIA IDENTIFICADA N° (SEC. ID. N°): 1

- 30 (1) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(1) LONGITUD: 23 aminoácidos
(2) TIPO: péptido
- 35 (2) TIPO DE MOLECULA: péptido
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 1:

40 Arg Ala Trp Ala Arg Ala Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ala Leu Ala Arg 16
1 5 10 15
Ala Leu Arg Ala Leu Ala Arg 23
45 20

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 187 320

② Nº de solicitud: 200001806

③ Fecha de presentación de la solicitud: 20.07.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C07K 14/00, A61K 48/00, C12N 15/87

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9913719 A1 (GENE THERAPY SYSTEMS, INC.) 25.03.1999, todo el documento.	1-24
A	WYMAN, T.B. et al. "Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers". BIOCHEMISTRY. 1997. Vol. 36, páginas 3008-3017. Todo el documento.	1-24
A	UHEREK, C. et al. "Modular fusion proteins for receptor-mediated gene delivery". NATO ASI Ser., Ser. H. 1998. Vol. 105, páginas 167-170. Todo el documento.	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.10.2001

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1