

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 639 307**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/EP2012/062642**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13001041**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12730554 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2726497**

---

(54) Título: **Péptidos con propiedades potenciadoras de infección vírica y su uso**

(30) Prioridad:

**30.06.2011 EP 11172279**

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

**26.10.2017**

(73) Titular/es:

**GENETHON (33.3%)  
1 bis rue de l'Internationale  
91000 Evry, FR;  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (33.3%) y  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)**

(72) Inventor/es:

**FENARD, DAVID;  
KICHLER, ANTOINE y  
MARTIN, SAMIA**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 639 307 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

Péptidos con propiedades potenciadoras de infección vírica y su uso

La presente invención se refiere a péptidos y derivados funcionales de los mismos y a su uso para mejorar la eficacia de transducción de virus en células diana.

5 Antecedentes de la invención

Las estrategias de terapia génica a menudos se ven limitadas por bajas eficacias de transducción de las células diana por parte de los vectores virales recombinantes. Los vectores retrovirales, y en particular los vectores lentivirales (LVs) basados en el virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) son vehículos prometedores para la terapia génica (D'Costa et al., 2009). Estos vectores se usan actualmente en aplicaciones clínicas para tratar diversas enfermedades tales como inmunodeficiencias, enfermedades neurodegenerativas o neurológicas, anemias, 10 infección de VIH. Algunas de las aplicaciones de los vectores retrovirales se basan en la transducción de células diana específicas *ex vivo*, tal como células madre/progenitoras hematopoyéticas que expresan el marcador CD34. Un factor limitante con el uso de partículas lentivirales recombinantes es la capacidad de obtener títulos altamente 15 infecciosos durante la producción de partículas de vector lentiviral recombinante. Un modo de solventar esta limitación es concentrar el sobrenadante viral durante las etapas de purificación (Rodrigues et al., 2007). Sin embargo, los protocolos de purificación son difíciles de establecer para algunos LVs, dependiendo de las glicoproteínas de envoltura usadas para pseudotipar partículas virales – como es el caso de los GALVTR-LVs (LVs 20 pseudotipados con glicoproteína de envoltura de virus de la leucemia de mono gibón fusionada a la cola citoplásmica de la glicoproteína de envoltura de virus de leucemia de ratón anfotrópico (MLV-A) (Sandrin et al., 2002)). Por lo tanto, muchas preparaciones de vector lentiviral presentan un título bajo y su eficacia de transducción 25 es limitada. Otro factor limitante es la capacidad del propio vector lentiviral para infectar células diana. Se pueden usar varias glicoproteínas de envoltura, tales como VSV-G, RD114TR, GALVTR, para pseudotipar vectores lentivirales y tener una capacidad de infección variable en células diana tales como células CD34+ (Sandrin et al., 2002). Una estrategia para solventar estas limitaciones es la adición de cofactores para optimizar los protocolos de 30 transducción, como polímeros catiónicos (p.ej., polibrene) o fragmentos de fibronectina (p.ej., retronectina) (Davis et al., 2004; Pollok et al., 1999). La Patente de EE.UU. nº 7.759.467 describe un método para aumentar la eficacia de transducción de células hematopoyéticas por retrovirus, que comprende la infección de las células en presencia de fibronectina o fragmentos de fibronectina. Sin embargo, el método propuesto no es totalmente satisfactorio por al menos dos razones. En primer lugar, los fragmentos de fibronectina usados para mejorar la eficacia de los retrovirus 35 presentan desventajas económicas significativas, ya que habitualmente comprenden unos 270 o más aminoácidos. Adicionalmente, el uso de fibronectina o de fragmentos de fibronectina requiere recubrir las placas de cultivo y precargar los sobrenadantes virales sobre los fragmentos de fibronectina inmovilizados. Estas dos etapas son difíciles de estandarizar y pueden conducir a una saturación de la transducción de la célula diana dependiendo de las concentraciones de fragmentos de fibronectina y de sobrenadante viral usadas (Novelli et al., 1999).

35 De forma destacable, los péptidos catiónicos naturales denominados SEVI han sido identificados recientemente en el semen humano como potenciadores fuertes de la capacidad de infección del VIH-1 (Munch et al., 2007; Roan et al., 2009). Esta familia de péptidos también ha sido descrita en la solicitud de patente internacional nº PCT/EP2007/050727, que describe fragmentos de los residuos de aminoácido 240 – 290 de la fosfatasa ácida prostática que promueven la infección viral de una célula.

40 La solicitud de patente internacional nº PCT/FR02/01772 describe péptidos catiónicos anfipáticos que presentan una carga absoluta superior o igual a 2 a pH 7,4, y que comprenden al menos una porción hidrofílica, comprendiendo dicha porción al menos tres residuos que son capaces de protonarse a un pH inferior a 7,4 con el objetivo de transferir un ácido nucleico o una proteína en una célula. Este documento no describe ni sugiere el uso de dichos 45 péptidos para mejorar la eficacia de transducción de un virus o de un vector viral. Además, estos péptidos catiónicos anfipáticos incluyen actividades antibióticas (Mason et al., 2009).

50 El objetivo de los inventores ha sido proporcionar los medios para mejorar la eficacia de transducción de un virus o de un vector viral, por ejemplo mejorando la administración de un gen a células diana. Puesto que los péptidos son interesantes por sus propiedades biodegradables, por su tamaño reducido, la simplicidad de caracterización y la producción a gran escala, se ha llevado a cabo una investigación intensiva para identificar alternativas a la fibronectina y a los péptidos SEVI.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que los péptidos particulares definidos en las reivindicaciones tienen la propiedad de promover la eficacia de transducción de virus en células eucarióticas y en particular en células progenitoras/madre hematopoyéticas primarias humanas.

55 Según un aspecto, la invención se refiere al uso *in vitro* o *ex vivo* del péptido LAH4 o a un derivado funcional del mismo, según se define en las reivindicaciones, para promover la infección de una célula eucariótica por un virus o un vector viral.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para infectar células eucarióticas con un virus o un vector viral, que comprende poner en contacto las células con el virus o vector viral en presencia del péptido LAH4 o de un derivado funcional del mismo, tal como se define en las reivindicaciones.

5 Según otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vivo* o *ex vivo* para aumentar la eficacia de la transferencia genética a células diana con vectores virales, que comprende poner en contacto las células diana con el vector viral en presencia del péptido LAH4 o un derivado funcional del mismo, tal como se define en las reivindicaciones, para promover la transferencia de secuencias de ácido nucleico (tales como un gen(es), cADNs, siARNs, shARNs, secuencias que permiten la producción de oligonucleótidos antisentido) en las células diana.

10 Según un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para diagnosticar una infección por un virus en un sujeto, que comprende incubar una muestra del sujeto con una célula eucariótica y el péptido LAH4 o un derivado funcional del mismo, tal como se define en las reivindicaciones, para amplificar cualquier virus contenido en dicha muestra, e identificar el virus amplificado.

Según un aspecto adicional, la invención se refiere a nuevos péptidos derivados de LAH4, tal como se define en las reivindicaciones.

15 Según otro aspecto, la invención se refiere a un péptido como se define en las reivindicaciones para uso en terapia génica para promover la infección de una célula eucariótica por un virus o un vector viral. Además se refiere, tal como se define en las reivindicaciones, al uso en combinación con un virus o vector viral en terapia génica.

#### Descripción detallada de la invención

20 En el contexto de la presente invención, el término “el péptido LAH4” se refiere al péptido con la secuencia de aminoácido que consiste en la SEQ ID NO: 1.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “derivado funcional de LAH4” y las declinaciones del mismo significan cualquier péptido cuya secuencia ha sido diseñada en base a la estructura primaria del péptido LAH4 y que tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral. En una realización particular, un derivado funcional de LAH4 es un péptido que tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus encapsulado en una envoltura GALV, RD114, MLV, VSV o GP64 en células eucarióticas, en particular células humanas, de ratón, de rata, de mono, de perro o de hámster, en particular una célula CD34+ humana. En una realización específica, el derivado funcional de LAH4 es un péptido que tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus encapsulado en una envoltura GALV en células CD34+ humanas.

Un derivado funcional de LAH4 según la invención presenta las siguientes características:

30 - comprende 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos. En una realización particular, el péptido comprende entre 20 y 30 aminoácidos, en particular entre 21 y 26, en particular entre 24 y 26;

- su extremo N-terminal comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4. En una realización particular, el extremo N-terminal comprende uno o dos residuos cargados positivamente a pH 7,4. En una realización particular, dichos aminoácidos son lisinas y/o argininas; y

35 - su región central forma una hélice cuando se representa según la representación de rueda de Schiffer-Edmundson (Schiffer et al., 1967), que es bien conocida en la técnica y corresponde a los 18 residuos de aminoácido que probablemente forman el dominio central del péptido. En una realización particular, la hélice es una hélice α según la representación de rueda de Schiffer-Edmundson. En una realización adicional, el péptido según la invención es un péptido catiónico anfipático o un péptido que comprende una hélice apolar. Según esta realización, 40 la región helicoidal central del péptido corresponde a los residuos de aminoácido que tienen una fuerte tendencia a formar una hélice (Georgescu et al, 2010). En esta realización, la región helicoidal central del péptido puede ser:

- una hélice apolar que alberga un grupo de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un lado de la hélice y residuos de alanina consecutivos en el otro lado de la hélice, definiendo dichos residuos de alanina consecutivos un ángulo de 60 a 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, y preferencialmente un ángulo de 140°

45 - o, una hélice anfipática que alberga un grupo de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un lado de la hélice y de dos a cuatro residuos de histidina en el otro lado de la hélice, que definen un ángulo hidrofílico de entre 60° y 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, y preferiblemente un ángulo de 140°.

En una realización particular, los aminoácidos del derivado funcional de LAH4 se seleccionan del grupo que consiste en alanina, histidina, leucina y lisina.

50 En el contexto de la presente invención, el término “péptido anfipático” denota un péptido que comprende aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, que son susceptibles de definir al menos una región hidrofílica y al menos una región hidrofóbica distinta, según se representa en la rueda de Schiffer-Edmundson.

En el contexto de la presente invención, el término “péptido helicoidal apolar” denota un péptido que comprende alanina y residuos de aminoácido hidrofóbicos que son susceptibles de definir al menos una región hidrofóbica distinta, según se representa en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson. Los residuos hidrofóbicos representativos que pueden estar presentes en los péptidos de la invención tienen un índice de hidropatía superior o igual a +1,9 (Kyte et al, 1982). Por consiguiente, los residuos hidrofóbicos representativos que pueden estar presentes en los péptidos de la invención incluyen valina, isoleucina y leucina. En una realización preferida, los residuos hidrofóbicos son residuos de leucina.

En el contexto de la presente invención, el término “péptido catiónico” denota un péptido que tiene una carga positiva absoluta a pH 7,4. En una realización preferida, las cargas positivas son proporcionadas por residuo(s) de arginina y/o lisina. Los aminoácidos naturales catiónicos no codificados por el código genético tal como la ornitina también pueden proporcionar cargas negativas en los péptidos de la invención.

En una realización alternativa, los restos cargados positivamente son acoplados a residuos de aminoácido. Dichos restos cargados positivamente incluyen, por ejemplo, etilenimina, espermina y espermidina, como es bien conocido en el campo.

Los péptidos derivados funcionales de LAH4 descritos en la presente memoria presentan la propiedad de aumentar la eficacia de transducción de virus y vectores virales, y pueden ser seleccionados fácilmente por un especialista en la técnica mediante el uso, por ejemplo, de los métodos descritos en los ejemplos. En la presente memoria se describen métodos para identificar dichos derivados funcionales del péptido LAH4. En una realización particular, los métodos incluyen

- seleccionar el péptido LAH4 o un derivado funcional conocido del mismo (por ejemplo uno de los mencionados a continuación en la presente memoria en las SEQ ID NOs: 1-27), un virus o vector viral de interés y una célula de interés;
- modificar el péptido LAH4 o el derivado funcional conocido del mismo para preparar un péptido variante; y
- medir la eficacia de transducción de una célula por parte del virus o vector viral en presencia del péptido variante,

en donde el péptido variante se considera un derivado funcional cuando se determina una transducción eficaz.

Los métodos también pueden incluir una etapa de comparar la eficacia de transducción del virus o vector viral obtenido con el péptido variante con la eficacia de transducción obtenida sin el péptido variante, o con la eficacia de transducción obtenida con un péptido conocido por su capacidad para mejorar la eficacia de transducción del virus o del vector viral en la célula.

La etapa de modificar el péptido LAH4 o un derivado funcional conocido del mismo puede comprender modificaciones tales como la mutación de un primer residuo de aminoácido del péptido LAH4 o del derivado funcional conocido del mismo para preparar un péptido variante. En una realización variante, la modificación incluye modificar covalentemente uno o más residuos de aminoácido del péptido LAH4 o de un derivado funcional conocido del mismo, como se muestra más adelante. Según otra variante, la modificación comprende la sustitución de los aminoácidos L naturales por aminoácidos D (en una o más posiciones del péptido, y en particular en todas las posiciones).

Los ejemplos de derivados funcionales del péptido LAH4 que pueden evaluarse usando dichos métodos incluyen los derivados funcionales preferidos mostrados en las SEQ ID NOs: 2-27. Los mismos derivados funcionales de las SEQ ID NOs: 2-27 y el péptido LAH4 de la SEQ ID NO: 1 también pueden usarse como base para el diseño de otros derivados funcionales según la invención. Además, los péptidos de las SEQ ID NOs: 1-27 que pueden usarse como controles en los métodos para identificar derivados funcionales según la invención.

En una realización particular de la invención, los péptidos comprenden residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en alanina, leucina, histidina, arginina y lisina.

En una realización particular del uso y métodos de la invención, el extremo N-terminal del péptido comprende una, dos o tres carga(s) positiva(s). En una variante específica de esta realización, la(s) carga(s) positiva(s) del extremo N-terminal del péptido es(son) proporcionada(s) por residuo(s) de arginina o lisina. En una variante adicional, los residuos cargados positivamente se encuentran en el final del extremo N. En una realización variante, el(es) primer(os) aminoácido(s) (p.ej. el primer residuo, o el primero y el segundo, o el primero y el tercero, etc.) es(son) residuo(s) neutro(s).

En una realización adicional del uso y métodos de la invención, el residuo más C-terminal es una alanina y en un aspecto adicional, cuando el extremo C del péptido comprende residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4, están localizados junto a la alanina C-terminal o están localizados en el extremo más N-terminal.

Los residuos representativos que pueden proporcionar cargas positivas en el extremo C son los residuos arginina y/o lisina.

En una realización particular del uso y los métodos de la invención, el péptido comprende cuatro residuos de histidina. En una realización específica, dichos residuos de histidina forman dos pares de histidinas adyacentes en una hélice representada según la rueda de Schiffer-Edmundson. Según una variante de esta realización, el péptido derivado de LAH4 comprende solo residuos de leucina o solo residuos de alanina en la porción de la hélice  $\alpha$  definida por el ángulo más pequeño entre los pares de histidina.

Según una realización específica, el péptido comprende cuatro residuos de histidina y tiene la secuencia

(K/R)<sub>a</sub>(K/R)<sub>b</sub>(K/A/L)<sub>c</sub>L<sub>d</sub>L(A/H/L)(A/H/L)(A/L)L(A/H/L)(A/H/L)(A/L)(A/L)(A/L)(H/L)(A/L)(H/L)(A/H/L)(A/L)(A/L)(A/H/L)(A/H/L)<sub>e</sub>L<sub>f</sub>(K/R)<sub>g</sub>K(R)<sub>h</sub>A<sub>i</sub>

en donde:

a, b, c y d representan 0 ó 1, con la condición de que a+b+c+d es igual a 2 ó 3, o preferiblemente 4; e, f, g, h e i representan independientemente 0 ó 1, siendo e+f+g+h+i igual a 2 ó 3 ó 4 ó preferiblemente 5.

En una realización variante, los residuos de histidina son sustituidos por otros grupos que se protonan a pH ácido: éstos incluyen grupos que contienen imidazol o residuos de ácido diaminopropiónico.

Los péptidos específicos usados en la invención pueden ser lo representado en la SEQ ID NO: 1 a 27:

LAH4: KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA (SEQ ID NO: 1)

LAH4-L1: KKALLAHLHLLALLALHLAHALKKA (SEQ ID NO: 2)

LAH4-L1-dKC: KKALLAHLHLLALLALHLAHALA (SEQ ID NO: 3)

20 LAH4-L1-R: RRALLAHLHLLALLALHLAHALRRA (SEQ ID NO: 4)

LAH4-L0: KKALLAHLAHLALLALHLALHLKKA (SEQ ID NO: 5)

LAH4-L2: KKALLALALHHLALLALHLAHALKKA (SEQ ID NO: 6)

LAH4-L3: KKALLALALHHLALLAHHHLALALKKA (SEQ ID NO: 7)

LAH4-L4iso: KKALLHALALLHAALLAHHHLALKKA (SEQ ID NO: 8)

25 LAH4-L5: KKALLHLALLHAALLAHLAALHLKKA (SEQ ID NO: 9)

LAH4-L6iso: KKALLHLALLLAALHALHLAALHLKKA (SEQ ID NO: 10)

LAH4-A1: KKALLAHLHLLAALALHLAHLLKKA (SEQ ID NO: 11)

LAH4-A2: KKALLLAALHHLAALALHLAHLLKKA (SEQ ID NO: 12)

LAH4-A3: KKALLLAALHHLALLAHHHLALKKA (SEQ ID NO: 13)

30 LAH4-A4: KKALLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 14)

LAH4-A5: KKALLHALLAHLAALLHALLHLKKA (SEQ ID NO: 15)

LAH4-A6iso: KKALLHALLAALLAHLHALLHLKKA (SEQ ID NO: 16)

LAH4-A4-K1N: KALLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 17)

LAH4-A4-K3N: KKLLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 18)

35 LAH4-A4-dKC: KKALLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 19)

LAH4-A4-d1aa: KKALLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 20)

LAH4-A4-d2aa: KKLLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 21)

LAH4-A4-d2Caa: KKALLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 22)

LAH4-A4-d3aa: KKLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 23)

40 LAH4-A4-d5aa: KKLHAALAHLLALAHLLALKKA (SEQ ID NO: 24)

LAH2-A6: KKALLHAALAHLLALAAALLALLKKA (SEQ ID NO: 25)

K2-L10A12-K2: KKALLAAALAALLALAAALLALLKKA (SEQ ID NO: 26)

LAH4-A4-Leu: KKLLLHALLAHLLALLHHILLALLKKL (SEQ ID NO: 27).

Según un segundo aspecto, la invención se refiere a nuevos péptidos derivados de LAH4. En este segundo aspecto, 5 la invención se refiere a un péptido anfipático que es un derivado funcional del péptido LAH4 de SEQ ID NO: 1, en donde el derivado funcional tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral, que comprende

- 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos. En una realización particular, el péptido comprende entre 20 y 30 aminoácidos, en particular entre 21 y 26, en particular entre 24 y 26;
- 10 - un extremo N-terminal que comprende de uno a tres residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4;
- al menos dos residuos de histidina, en particular cuatro residuos de histidina, que definen un ángulo hidrofílico comprendido entre 80° y 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, más específicamente un ángulo de 140°;
- 15 - siendo seleccionados los otros aminoácidos del péptido entre residuos de alanina y leucina;

en donde en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson dicho péptido comprende solo residuos de alanina entre los residuos de histidina más distantes en el ángulo más pequeño definido por dichos residuos de histidina.

Estos nuevos péptidos del segundo aspecto son derivados funcionales del péptido LAH4 tal como se han definido anteriormente.

20 En una realización particular del segundo aspecto, el ángulo hidrofílico está comprendido entre 120 y 180°, siendo el ángulo más preferido 140°.

Según una realización particular de este segundo aspecto, el extremo N-terminal del péptido de la invención comprende una, dos o tres (en particular una o dos) carga(s) positiva(s) a pH 7,4 (proporcionadas en particular por residuos de arginina y lisina, preferiblemente residuos de lisina). Los residuos cargados positivamente 25 preferiblemente están localizados en el final del extremo N-terminal, y preferiblemente de forma contigua si hay presente más de uno residuo cargado positivamente.

En otra realización particular del segundo aspecto, el péptido de la invención presenta un extremo C-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4. Los residuos representativos que pueden proporcionar cargas positivas en el extremo C-terminal son residuos de arginina y/o lisina.

30 En una realización adicional del segundo aspecto, el residuo C-terminal es una alanina y en un aspecto adicional, cuando el extremo C-terminal del péptido comprende residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4 están localizados junto a la alanina C-terminal o están localizados en el extremo más N-terminal.

Según otra realización particular del segundo aspecto, el péptido de la invención comprende cuatro residuos de 35 histidina. En una realización específica, dichos residuos de histidina forman dos pares de histidinas adyacentes en una hélice α representada según la rueda de Schiffer-Edmundson.

En una realización adicional del segundo aspecto, el péptido derivado de LAH4 es un isómero del péptido LAH4, es decir, contiene el mismo número de residuos de alanina, histidina, leucina y lisina, en un orden diferente en la secuencia primaria.

40 Los péptidos representativos del segundo aspecto cubiertos por esta definición se muestran en las SEQ ID NOs: 11-25 y 27. Por tanto, la invención se refiere a un péptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 11-25 y 27.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a nuevos péptidos derivados de LAH4 que presentan la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral, que comprenden:

- 45 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos. En una realización particular, el péptido comprende entre 20 y 30 aminoácidos, en particular entre 21 y 26, en particular entre 24 y 26;
- un extremo N-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4;
- 50 una hélice apolar que alberga un grupo de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un lado de la hélice y residuos de alanina consecutivos en el otro lado de la hélice, que definen un ángulo de 60 a 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, y preferencialmente un ángulo de 140°.

En una variante particular de este tercer aspecto, los otros aminoácidos del péptido se seleccionan entre residuos de alanina y leucina.

Estos nuevos péptidos del tercer aspecto son derivados funcionales del péptido LAH4 tal como se ha definido anteriormente.

5 Estos péptidos contienen una hélice apolar, es decir, los residuos de aminoácido de la hélice son hidrofóbicos (o apolares). Los residuos de aminoácido hidrofóbicos representativos contenidos preferiblemente en la hélice apolar del péptido de la invención comprenden residuos de alanina, isoleucina, leucina y valina, en particular residuos de alanina y leucina.

10 En una realización particular del tercer aspecto, los aminoácidos del grupo de aminoácidos hidrofóbicos son seleccionados del grupo que consiste en residuos de leucina y alanina. En otra realización particular, los aminoácidos del grupo de aminoácidos hidrofóbicos son residuos de leucina.

El péptido K2-L10A12-K2 (SEQ ID NO: 26) es un péptido representativo según esta definición.

15 Según una realización particular del tercer aspecto, el extremo N-terminal del péptido de la invención comprende una, dos o tres (en particular una o dos) carga(s) positiva(s) a pH 7,4 (proporcionadas en particular por residuos de arginina o lisina, preferiblemente residuos de lisina). Los residuos cargados positivamente preferiblemente están localizados en el final del extremo N, y preferiblemente de forma contigua si hay presente más de un residuo cargado positivamente.

20 En otra realización particular del tercer aspecto, el péptido de la invención presenta un extremo C-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4. Los residuos representativos que pueden proporcionar cargas positivas en el extremo C-terminal son residuos de arginina y/o lisina.

En una realización adicional del tercer aspecto, el residuo C-terminal es una alanina y en un aspecto adicional, cuando el extremo C-terminal del péptido comprende residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4, están localizados a continuación de la alanina C-terminal o están localizados en el extremo más N-terminal.

25 Según un cuarto aspecto, la invención se refiere a un péptido anfipático que es un derivado funcional de LAH4, en donde el derivado funcional de LAH4 tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral, que comprende

- 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos. En una realización particular, el péptido comprende entre 20 y 30 aminoácidos, en particular entre 21 y 26, en particular entre 24 y 26;
- un extremo N-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4;
- al menos dos residuos de histidina, preferiblemente cuatro residuos de histidina, que definen un ángulo hidrofílico comprendido entre 140° y 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, más específicamente un ángulo de 140°;

35 en donde en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson dicho péptido comprende solo residuos de leucina entre los residuos de histidina más distantes en el ángulo más pequeño definido por dichos residuos de histidina.

En una realización particular de este cuarto aspecto, los otros aminoácidos del péptido se seleccionan entre residuos de alanina y de leucina.

El péptido de este cuarto aspecto no es el péptido LAH4-L4 de la SEQ ID NO: 36 y no es el péptido LAH4-L6 de la SEQ ID NO: 37.

40 En una realización particular de este cuarto aspecto, el péptido de la invención es un isómero del péptido LAH4 de la SEQ ID NO: 1, cuya secuencia de aminoácido consiste en 8 residuos de alanina, 4 de histidina, 10 de leucina y 4 de lisina.

45 Según una realización particular de este cuarto aspecto, el extremo N-terminal del péptido de la invención comprende una, dos o tres (en particular una o dos) carga(s) positiva(s) a pH 7,4 (proporcionadas en particular por residuos de arginina o lisina, preferiblemente residuos de lisina). Los residuos cargados positivamente preferiblemente están localizados al final del extremo N-terminal, y preferiblemente de forma contigua si está presente más de un residuo cargado positivamente.

50 En otra realización particular del cuarto aspecto, el péptido de la invención presenta un extremo C-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4. Los residuos representativos que pueden proporcionar cargas positivas en el extremo C-terminal son residuos de arginina y/o lisina.

En una realización adicional del cuarto aspecto, el residuo C-terminal es una alanina y en un aspecto adicional, cuando el extremo C-terminal de péptido comprende residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4, están localizados junto a la alanina C-terminal o están localizados en el extremo más N-terminal.

5 Los péptidos representativos cubiertos por este cuarto aspecto incluyen los péptidos LAH4-L4iso, LAH4-L5 y LAH4-L6iso (SEQ ID NOs: 8-10). Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un péptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8-10.

10 Están disponibles varios métodos para la producción e péptido de la invención y son conocidos por los especialistas en la técnica. Según un primer método, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de la invención es expresada en bacterias tales como *E. coli* o cualquier otro sistema de expresión. A continuación el péptido es purificado según métodos convencionales. De acuerdo a un segundo método, el péptido es sintetizado usando un 15 sintetizador (véase, por ejemplo, Bechinger, 1996).

15 Los péptidos de la invención son derivados del péptido LAH4. Aunque este último es reconocido como promotor de la transfección de ácidos nucleicos en células eucarióticas, sus propiedades ventajosas en la promoción de la transducción de virus no ha sido descrita o sugerida nunca. Aquí los inventores muestran que el péptido LAH4 y sus derivados promueven la infección viral de una célula diana y potencian la capacidad de infección de células por virus.

20 Otras realizaciones adicionales de la invención son péptidos derivados del péptido LAH4 o de sus derivados funcionales, según se describe a continuación, con al menos una de las siguientes modificaciones covalentes:

- acilación, acetilación, enlace a un grupo portador macromolecular no peptídico; preferiblemente en el extremo N;
- amidación, enlace a un grupo portador macromolecular no peptídico; preferiblemente en el extremo C;
- glicosilación; preferiblemente en las cadenas laterales de los aminoácidos;
- enlace a una proteína adaptadora, que promueve la captación del péptido al interior de las células, o enlace a un grupo hidrofóbico, preferiblemente un lípido, un ácido graso, un dansilo, un grupo carbobenzoxilo o t-butiloxicarbonilo;
- oxidación, sulfatación, esterificación, formación de lactona y/o fosforilación.

25 La invención también cubre multímeros, por ejemplo dímeros o trímeros, de los péptidos descritos anteriormente. En el contexto de la presente invención, un "multímero" denota péptidos LAH4 funcionales que han sido unidos covalentemente unos a otros. Los dímeros, que son dos péptidos LAH4 funcionales unidos entre sí, pueden obtenerse por ejemplo mediante introducción de grupos tiol en el extremo C o N – estos grupos pueden usarse entonces para generar dímeros por formación de un puente de disulfuro. Por supuesto, también pueden usarse otros reactivos para generar dichos multímeros.

30 Según la invención, el péptido LAH4 o un derivado funcional del mismo (p.ej., una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-27) está amidado en su extremo C o no está modificado en su extremo C.

35 Los grupos portadores macromoleculares preferidos son polietilen glicol (PEG), polioxialquilen glicol, ésteres de polisorbato, manzano, amilopectina, pululano, nanopartículas de hidrogel de polisacáridos hidrofobizados auto-agregados, polilisina, anticuerpos o albúmina.

40 En la presente memoria también se describen derivados retro, inverso o retro-inverso de los péptidos definidos anteriormente, que retienen las propiedades promotoras de la transducción descritas en la presente memoria. Los péptidos pueden comprender al menos un aminoácido D, así como iminoaminoácidos y aminoácidos raros. La descripción también se refiere a miméticos peptídicos de los péptidos según la invención. Éstos pueden caracterizarse por ejemplo por una modificación de uno o más enlaces peptídicos, por ejemplo, por un enlace peptídico inverso o por un enlace de éster. Pero incluye también péptidos con beta o gamma aminoácidos, etc...

45 Los péptidos de la invención promueven la infección viral de una célula. Tal como se usa en la presente memoria, "virus" se refiere a virus naturales y a virus artificiales. Por ejemplo, paramixovirus (tal como el virus respiratorio sincitial, virus del sarampión), ortomixovirus (tal como el virus de la gripe), flavivirus (tal como el virus de la hepatitis C), hepadnavirus (tal como el virus de la hepatitis B), rabdovirus (tal como la rabia, VSV), coronavirus (tal como SARS), togavirus (tal como el virus Sindbis, el virus Chikungunya), filovirus (tal como el virus del ébola), arenavirus, poxvirus, herpesvirus, bunyavirus, bornavirus, arterivirus, baculovirus. Según una realización particular, los virus son virus artificiales, que por ejemplo pueden comprender un ácido nucleico diseñado para terapia génica. En una realización preferida, los virus son virus con envoltura. En realizaciones preferidas, los virus son retrovirus y en particular lentivirus. Los inventores han demostrado que los péptidos de la presente invención pueden promover la infección de células eucarióticas con vectores lentivirales (LVs) derivados de VIH-1 que comprenden envolturas pseudotipadas con glicoproteínas procedentes de virus estomatis vesicular (VSV), retrovirus endógeno de felino

modificado (RD114), virus de leucemia de ratón anfotrófico (MLV), virus de leucemia de mono gibón modificado (GALV) e incluso con glicoproteínas procedentes de baculovirus AcMNPV (GP64), siendo el último un virus específico normalmente para células de insecto. En vista de la eficacia de la transducción obtenida con los péptidos de la invención y de la diversidad de las glicoproteínas usadas en los experimentos descritos, es evidente que los presentes péptidos pueden usarse como medio general para aumentar las eficacias de transducción de virus de envoltura en células eucarióticas.

Las células diana pueden ser cualquier clase de células eucarióticas tales como células de mamífero, en particular células humanas, de ratón, de rata, de mono, de perro o de hámster. En una realización particular, la célula diana es una célula CD34+, en particular una célula CD34+ tomada de un paciente que necesita terapia génica de su linaje hematopoyético. Otros tejidos/células diana representativos, no limitativos, son las células cutáneas, de músculo, hígado, ojo, neuronas, linfocitos, fibroblastos, queratinocitos, adipocitos, mioblastos, hepatocitos, células tumorales, y de forma más general cualquier célula eucariótica que sea conocida o que se identifique como diana de un virus.

La actividad de los péptidos con un virus dado y una célula diana dada se puede determinar usando un ensayo indicador, por ejemplo usando un ensayo de luciferasa o un ensayo de expresión GFP tal como se muestra en los ejemplos. En particular, los péptidos se pueden evaluar según el siguiente método:

- las células (p.ej., células HCT116 o células 293T) se llevan a una placa de cultivo, por ejemplo una placa de 12 pocillos (p.ej. a  $10^5$  células/pocillo) y se mantienen durante una noche a 37°C;
- se incuban virus que comprenden el transgén GFP en ausencia o en presencia de diversas concentraciones de péptidos (p.ej., 3, 6 y/o 12 µg/mL) durante 15 minutos a 37°C;
- los virus, tanto solos como mezclados con los péptidos, son mezclados a continuación con las células;
- opcionalmente, tras un tiempo suficiente para que se produzca la infección, por ejemplo 6 horas después de la etapa previa, se puede eliminar el medio y sustituirlo por medio de cultivo fresco;
- las células son cultivadas otros 2 a 3 días;
- la eficacia de transducción se determina monitorizando la expresión de GFP usando medios adaptados, por ejemplo citometría de flujo.

En la presente memoria también se describe un método para identificar péptidos útiles para promover la transducción de una célula por un vector (encapsulado). Dicho método puede implementar las etapas proporcionadas en el párrafo anterior para identificar péptidos que potencian la infección viral en células al menos en un factor de 2, más preferiblemente en un factor de 3, 5 o 10 con respecto a la infección viral en células en ausencia del péptido.

En los usos y métodos de la presente invención, el péptido LAH4 y los derivados funcionales del mismo se usan en una cantidad efectiva. En la presente invención, el término “cantidad efectiva” del péptido denota la cantidad requerida para aumentar significativamente la eficacia de transducción de un vector viral. Dicha cantidad efectiva generalmente dependerá del péptido particular usado, de la célula diana y del vector viral implementado. Dicha cantidad puede determinarse según métodos bien conocidos en la técnica, en particular según el método anterior que implementa un ensayo indicador y que se ilustra en los ejemplos. Por ejemplo, los inventores han demostrado que la concentración óptima de LAH4-L1 necesaria para promover la transducción de células CD34+ con GALVTR-LV es de aproximadamente 12 µg/mL (concentración final en el medio de transducción).

Según un aspecto adicional, la descripción se refiere a un complejo de un péptido LAH4 o a un derivado funcional del mismo con una partícula vírica, en particular una partícula vírica con envoltura, más particularmente con un vector viral con envoltura para terapia génica. Adicionalmente, otro aspecto de la descripción se refiere a un método para preparar dicho complejo, que comprende mezclar el péptido con una partícula viral.

Según otro aspecto, la descripción se refiere a una mezcla de un péptido LAH4 o un derivado funcional del mismo con una partícula vírica (en particular una partícula vírica con envoltura, más particularmente un vector viral con envoltura para terapia génica) y con una célula. Adicionalmente, otro aspecto de la descripción se refiere a un método para preparar dicha mezcla, que comprende mezclar el péptido con la partícula viral y la célula.

Los péptidos según la invención pueden usarse en composiciones farmacéuticas. De esta manera, la presente descripción se refiere a una composición que comprende un péptido como el definido anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Las composiciones farmacéuticas contienen uno o más de los péptidos según la invención, o una sal fisiológicamente aceptable del péptido(s). Las composiciones farmacéuticas también pueden contener agentes auxiliares farmacéuticos habituales que contribuyen, por ejemplo, a la solubilidad, la estabilidad o la esterilidad de la composición, o que incrementan la eficacia de la captación en el organismo.

En la presente memoria también se describe un péptido como el definido anteriormente, para uso como medicamente. En un ejemplo particular, el medicamento se usa para aumentar la eficacia de un vector viral de terapia génica (D'Costa et al., 2009).

5 La forma y el contenido de la composición farmacéutica que contiene el péptido(s) dependen de la ruta de administración. Preferiblemente, se seleccionan formulaciones galénicas y formas de aplicación en las que el péptido(s) alcance(n) el sitio diana en condiciones no degradadas. El medicamento puede administrarse localmente en forma de inyección, gotas, spray, comprimidos, supositorios, crema, pomada, gel, etc. Es posible llevar a cabo la administración en forma de bolo o repetidamente a lo largo de un periodo de tiempo.

10 El péptido, complejo o composición farmacéutica o medicamento descritos en la presente memoria pueden administrarse *in vivo*, por ejemplo mediante inyección por vía intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intra-peritoneal o intracraneal. La descripción también se refiere a un método para terapia génica, que comprende administrar a un paciente que lo necesite un péptido, complejo o composición farmacéutica como los descritos anteriormente. El método comprende también la administración de un vector vírico para terapia génica antes, después o simultáneamente a la administración del péptido de la invención.

15 En la presente memoria se describe adicionalmente una composición que comprende un péptido como el descrito anteriormente en un medio de cultivo, estando dicha composición destinada a uso como reactivo promotor de infección para facilitar la transducción de una célula con un virus o un vector viral, en particular un virus o vector viral con envoltura. De esta manera, la descripción también se refiere a un reactivo promotor de infección vírica que comprende un péptido según la presente invención, en un medio adecuado, en particular en un medio de cultivo adecuado.

20 Según otro aspecto, en la presente memoria se describe el uso del péptido LAH4 o de un derivado funcional del mismo como un antibiótico.

25 Según otro aspecto, en la presente memoria se describe el uso de un derivado funcional de LAH4 como péptido de penetración celular (CPP, del inglés "cell penetrating peptide"). En particular, el péptido se usa como sistema de administración para compuestos bioactivos tales como ácido nucleico, por ejemplo ADN de plásmido, siARNs, oligonucleótidos antisentido, y otros compuestos bioactivos (péptidos o proteínas, en particular péptidos o proteínas terapéuticos, péptidos marcadores, anticuerpos, etc.). El CPP puede estar unido covalentemente o no covalentemente al compuesto bioactivo. En un ejemplo particular, el péptido es un derivado funcional de péptido LAH4.

30 En la presente memoria se describen además ácidos nucleicos que codifican para los péptidos de la invención y vectores de expresión para los péptidos inventivos, tales como plásmidos, cósmidos y vectores virales.

Los péptidos descritos en la presente memoria se usan para un amplio rango de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas y son herramientas de laboratorio valiosas para el desarrollo y el estudio de la entrada de virus en células.

35 En la presente memoria se describe adicionalmente el uso del péptido LAH4 o de un derivado funcional del mismo como potenciador general de infecciones virales o de eficacias de transducción para la práctica rutinaria de laboratorio o para estrategias terapéuticas génicas basadas en sistemas de vector viral. Los péptidos potencian la entrada de vectores diseñados para terapia génica en células *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Pueden administrarse en combinación con un vector viral para terapia génica y mediar la entrada del vector viral en la célula diana. Los péptidos también son útiles *in vitro* porque promueven la captación de virus en las células. De esta manera resultan útiles como herramienta para estudiar virus y sus mecanismos de acción. Otro ejemplo es el uso del péptido LAH4 o de sus derivados funcionales para estrategias diagnósticas, especialmente las de virus tipo VIH-1 y otros virus con envoltura. El péptido LAH4 y sus derivados funcionales potencian los títulos de infección de las partículas víricas y por tanto potencian la captación celular, permitiendo la detección de contaminaciones virales residuales. Por tanto, pueden usarse para aislar partículas virales de muestras tales como suero, sangre, plasma, esperma o tejidos derivados de sujetos, en particular de un sujeto humano que se sospeche que está infectado por un virus, más específicamente por un virus con envoltura. Los péptidos según la invención también pueden usarse para estudiar partículas virales presentes en agua, comida (gripe aviar, SARS) o cualquier virus (con envoltura) usado en bioterrorismo. El aislamiento exitoso de virus podría verse favorecido varias veces en comparación con los métodos diagnósticos rutinarios. Los métodos preferidos son los ensayos de afinidad de unión y los métodos para eliminar virus cuantitativamente de disoluciones que se sospecha o que se sabe que comprenden virus a fin de obtener disoluciones seguras. En dichos métodos, los péptidos de la invención preferiblemente están unidos covalentemente a un soporte o una columna.

55 En la presente memoria se describen adicionalmente polinucleótidos que codifican para los péptidos según la invención, estando dichos polinucleótidos constituidos preferiblemente por ADN, ARN, ADN genómico o PNA. Otro aspecto de la descripción se refiere a vectores que contienen el polinucleótido descrito en la presente memoria y células hospedantes modificadas genéticamente que contienen el vector descrito en la presente memoria.

Los péptidos de la invención pueden usarse para potenciar en general la entrada de partículas víricas en células diana. Los péptidos también pueden usarse como potenciador general de la tasa de infección/transducción de partículas virales con envoltura que portan glicoproteínas de envoltura ajenas (pseudopartículas) como la proteína G del Virus de Estomatitis Vesicular (VSV-G), la proteína Env del MLV, etc. Los mencionados péptidos de la invención

5 promueven las tasas de infección de todas las partículas de virus con envoltura analizadas. Esto nos permite llevar a cabo experimentos de infección, especialmente en células primarias, que no habían sido posibles anteriormente. Los péptidos de la invención son por tanto útiles como herramientas de laboratorio *in vitro*.

Los péptidos de la invención también pueden usarse para potenciar las tasas de administración génica en estrategias de terapia génica *ex vivo* o *in vivo* basadas en sistemas de vectores, en particular en sistemas de vectores con envoltura. Por consiguiente, la descripción también se refiere a un péptido como el descrito

10 anteriormente para uso en terapia génica para promover la infección de una célula eucariótica con un virus o un vector viral en un sujeto que lo necesite. El péptido de la invención puede usarse en combinación con un virus o un vector viral en terapia génica. El péptido puede ser para administración simultánea, separada o secuencial con el vector de terapia génica. La generación de vectores retrovirales altamente infecciosos para terapia génica, especialmente para terapia génica *ex vivo* de células madre, es un procedimiento difícil. En particular, las eficacias de transducción de vectores retrovirales para células madre son bajas. En presencia de los péptidos de la invención, sin embargo, las células y las líneas celulares madre pueden ser transducidas eficazmente con vectores retrovirales, dando como resultado mayores eficacias para la administración génica en la célula diana en comparación con las muestras que no contienen péptido.

15 20 En los métodos *in vitro* y *ex vivo* de la presente invención, el péptido puede usarse con o sin inmovilización previa en un soporte sólido. De forma ventajosa, no se requiere ninguna inmovilización para obtener un aumento de la eficacia de transducción.

25 En una realización particular de los métodos *in vitro* de la invención, se usan otros medios de mejora de la transducción junto con el péptido LAH4 o el derivado funcional del mismo. Por ejemplo, en una realización particular, la eficacia de transducción se incrementa con un péptido según la invención y con Retronectina o un péptido SEVI.

En la presente memoria se describe además un kit que comprende un péptido como el definido anteriormente y un virus o un vector viral.

La invención se describe adicionalmente a través de los siguientes ejemplos.

#### Leyendas de las figuras

30 **Figura 1. Capacidad de LAH4-L1 para potenciar los títulos infecciones de LV. A)** Se usaron GALVTR-LVs, MLV-A-LVs, RD114TR-LVs, VSV-G-LVs y VLPs para transducir células HCT116 ( $1,2 \times 10^5$  TU/mL o 200 ng/mL de VIH-1 p24 para VLPs). Se usaron GP64-LVs para transducir células 293T ( $0,8 \times 10^5$  TU/mL). Las transducciones se llevaron a cabo en ausencia o en presencia de 3, 6 ó 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LAH4-L1. Los datos se muestran como porcentajes de células GFP+ con desviaciones estándar (SD) de condiciones triplicadas. **B)** Los datos obtenidos en (A) se presentan como el número de veces de incremento mediado por LAH4-L1 con las condiciones de control normalizadas a uno.

35 **Figura 2. Determinación de la concentración óptima de LAH4-L1 para promover la transducción de células CD34+ humanas con GALVTR-LVs. A)** Células hCD34+ pre-activadas fueron transducidas con GALVTR-LVs ( $2 \times 10^6$  TU/mL, MOI 16) pre-incubados o no con diversas concentraciones de LAH4-L1. Se representan las eficacias de transducción (cuadrados negros) como los porcentajes de células GFP+ obtenidos 5 días después de la transducción. La mortalidad (círculos grises) se estimó dos días después de la transducción tras marcaje de ADN celular con 7-ADD. **B)** Células hCD34+ fueron transducidas con dos dosis diferentes de GALVTR-LVs (1 y  $2 \times 10^6$  TU/mL, MOI 8 y 16) pre-incubados o no con la concentración óptima de LAH4-L1 (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los datos se obtienen de seis donantes de cordón umbilical diferentes (tres donantes por cada dosis de GALVTR-LV). Las barras indican el valor medio de las distribuciones.

40 **Figura 3. Evaluación de la seguridad de LAH4-L1 en el modelo de ratones de “Sistema Inmune Humano” (BALB-Rag/ $\gamma$ C).**

45 Antes de la inyección en siete ratones rag-/-/ $\gamma$ C/- de la misma camada, las células hCD34+ se dejaron sin transducir (triángulo) o fueron transducidas con GALVTR-LVs (MOI 8), en presencia de 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LAH4-L1 (cuadrado) o de 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de Retronectina (círculo). **A)** Doce semanas después de la inyección, se monitorizó el nivel de injerto efectivo de ratones HIS (BALB-Rag/ $\gamma$ C) siguiendo los porcentajes de células hCD45+ (GFP+) transducidas en la sangre, la médula ósea (BM, del inglés “bone marrow”), el bazo y el timo usando citometría de flujo. **B y C)** Estudio de linfopoyesis T humana *in vivo* en el timo siguiendo la expresión de marcador TCR $\alpha/\beta$  humano en el subconjunto de células hCD45+ y la expresión de los marcadores CD4 y CD8 humanos en el subconjunto de células hCD3+. La linfopoyesis T se analiza en las células sin transducir (B) o en las células transducidas (C). **D a G)** Estudio del desarrollo linfoidé B humano, monocitos humanos y células asesinas naturales humanas *in vivo* en el bazo (D y E) y en la BM (F y G) siguiendo respectivamente la expresión de marcador CD19, CD14 y CD56 humano en el subconjunto de células hCD45+ sin transducir (D y F) o transducido (E y G). Los progenitores hematopoyéticos

humanos también son analizados en la BM siguiendo la expresión de marcador CD34 humano en el subconjunto de células hCD45+.

**Figura 4. Transducción de células CD34+ humanas con GALVTR-LV en presencia de derivados de LAH4-L1.**

**A)** Tabla de secuencias de péptidos de diversos derivados de LAH4-L1 (la secuencia D-LAH4-L1 es idéntica a la LAH4-L1 pero con aminoácidos D). **B)** las células hCD34+ fueron transducidas con GALVTR-LVs (10E6 TU/mL, MOI 8) pre-incubadas o no (Simulado) con LAH4-L1 o diferentes derivados de LAH4-L1 (12 µg/mL). Las eficacias de transducción se expresan como porcentajes de la condición de control de LAH4-L1. **C)** La mortalidad se estimó dos días después de la transducción tras marcado de ADN celular con 7-AAD. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado con SD.

**Figura 5. Transducción de células CD34+ humanas con GALVTR-LVs en presencia de isómeros de LAH4-L1.**

Tabla de secuencias de péptidos de la serie L (**A**) y la serie A (**D**) de isómeros de LAH4-L1. **B y E)** representación de rueda helicoidal de Schiffer-Edmundson de la región de hélice α anfipática (aa6 a aa23) de los isómeros de LAH4-L1. El nombre del péptido y el ángulo polar formado por los residuos de Histidina hidrofílicos (subrayados) se mencionan en el interior de la proyección de la rueda. **C y F)** células hCD34+ fueron transducidas con GALVTR-LVs (10E6 TU/ mL, MOI 8) pre-incubadas con 12 µg/mL de LAH4-L1 o diferentes isómeros de LAH4-L1 de la serie L (**C**) o de la serie A (**F**). Las eficacias de transducción se representan como los porcentajes de células GFP+ obtenidas 5 días después de la transducción. Los datos se expresan como el promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado con SD.

**Figura 6. Curvas dosis-respuesta de LAH4-L1, LAH4-A4 y LAH4-A5 en la transducción de células CD34+ humanas con GALVTR-LVs.** **A)** células hCD34+ fueron transducidas con GALVTR-LVs (10E6 TU/mL, MOI 8) pre-

incubadas o no con varias concentraciones de LAH4-L1, LAH4-A4 y LAH4-A5 (3, 6 y 12 µg/mL). Las eficacias de transducción se representan como los porcentajes de células GFP+ con SD obtenidos 5 días post-transducción. **B)** La mortalidad se estimó como en la Figura 4C.

**Figura 7. Transducción de células CD34+ humanas con GALBTR-LVs en presencia de derivados de histidina de LAH4-A4.** **A)** Tabla de secuencias de péptidos de LAH4-A4, LAH2-A4, LAH2-A6 y K2-L10A12-K2. **B)** Representación de rueda helicoidal de Schiffer-Edmundson de la región de hélice α anfipática (aa6 a aa23) de los derivados de histidina de LAH4-A4. El nombre del péptido y el ángulo polar formado por los residuos de Histidina hidrofílicos (subrayados) se mencionan en el interior de la proyección de la rueda. **C)** células hCD34+ fueron transducidas con GALVTR-LVs (10E6 TU/ mL, MOI 8) pre-incubadas con LAH4-A4 o con diferentes isómeros de histidina de LAH4-A4 (12 µg/mL). Las eficacias de transducción se expresan como los porcentajes de la condición de control de LAH4-A4. **D)** La mortalidad se estimó como en la Figura 4C. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado con SD.

**Figura 8. Transducción de células CD34+ humanas con GALVTR-LVs en presencia de derivados de lisina de LAH4-A4.** **A)** Tabla de secuencias de péptido de LAH4-A4, LAH4-A4-dKN, LA4-A4-K1N, LAH4-A4-K3N y LAH4-A4-dKC. **B)** células hCD34+ fueron transducidas con GALVTR-LVs (10E6 TU/mL, MOI 8) pre-incubadas con LAH4-A4 o con diferentes derivados de lisina de LAH4-A4 (12 µg/mL). Las eficacias de transducción se expresan como los porcentajes de la condición de control de LAH4-A4. **C)** La mortalidad se estimó como en la Figura 4C. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado con SD.

**Figura 9. Transducción de células CD34+ humanas con GALVTR-LVs en presencia de varios derivados de LAH4-A4.** **A)** Tabla de secuencias de péptidos. **B)** células hCD34+ fueron transducidas con GALVTR-LVs (10E6 TU/mL, MOI 8) pre-incubadas con LAH4-A4 o diferentes derivados de LAH4-A4 (12 µg/mL). Las eficacias de transducción se expresan como los porcentajes de la condición de control de LAH4-A4. **C)** La mortalidad se estimó como en la Figura 4C. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado con SD.

**Figura 10. Transducción de células CD34+ humanas con GALVTR-LVs en presencia de LAH4-A4 o péptidos SEVI.** **A)** células hCD34+ fueron transducidas con GALVTR-LVs (10E6 TU/mL, MOI 8) pre-incubadas con LAH4-A4 (12 µg/mL, 2,2 µM) o péptido SEVI (20 µg/mL, 2,2 µM). Las eficacias de transducción se representan como los porcentajes de células GFP+ obtenidas 5 días post-transducción. **B)** La mortalidad se estimó como en la Figura 4C. Datos obtenidos de tres donantes de sangre de cordón diferentes por duplicado. Las barras indican el valor medio de las distribuciones.

**Figura 11. Transfección de células 293T con pEGFP en presencia de péptidos LAH4-A4, LAH4-L1 o K2-L10A12-K2.** Se mezcló pEGFP-C1 (1 µg) en 50 µL de disolución de NaCl 150 mM con 3 µg, 4,5 µg, 6 µg o 9 µg de LAH4-A4, o con 6 µg de LAH4-L1, o con 6 µg de K2-L10A12-K2. A continuación, se diluyó la mezcla de ADN/péptido en 200 µL de DMEM sin FCS y se cargó en monocapas de células. 3 horas post-transfección se reemplazó el medio con DMEM que contenía un 10% de FCS. 48 h después, se estimaron las eficacias de transfección monitorizando la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado con la SD.

**Figura 12. Efecto de LAH4-A4 sobre los pseudotipos RD114TR-LVs y GALV-MLVs.** Células hCD34+ fueron transducidas con sobrenadantes crudos de RD114TR-LVs ( $3,8 \times 10^6$  TU/mL) o de GALV-MLVs de vector retroviral de mono azul ( $5 \times 10^5$  TU/mL) en ausencia o en presencia de 12 µg/mL de los péptidos LAH4-L1, LAH4-L4<sub>ISO</sub>, LAH4-A4 o LAH4-A5. Las eficacias de transducción se representan como el porcentaje de células GFP+ con SD obtenidas 5 días post-transducción. Datos obtenidos de dos donantes de sangre de cordón diferentes por duplicado para el RD114TR-LV o de tres donantes de sangre de cordón diferentes sin duplicar para el GALV-MLV.

5

Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Péptidos y Reactivos

10 Los péptidos fueron producidos mediante síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc estándar, se purificaron mediante HPLC RP preparativo y se analizaron mediante HPLC y MS (Genecust, Dudelange, Luxemburgo). Todos los péptidos fueron amidados en su extremo C-terminal, excepto el LAH4-A4-dNH2, y el SEVI. 7-amino-actinomicina D (7-AAD) se obtuvo en Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, Francia). La retronectina procedía de Takara Bio Inc. (St-Germain-en-laye, Francia). El plásmido pEGFP-C1 era de Clontech (St-Germain-en-laye, Francia). Los anticuerpos eran de Miltenyi (París, Francia).

15

Además de los péptidos representados en las SEQ ID NOs: 1-27, también se han usado los siguientes péptidos en el presente estudio:

LAH4-A4-P14: KKALLHAALAHLLPLAHLLALLKKKA (SEQ ID NO: 28)

LAK4-L1: KKALLAKALKLLALLALKLAKALKKA (SEQ ID NO: 29)

20

LAH8-L1: HHALLAHLHLLALLALHLAHLHHA (SEQ ID NO: 30)

LAH4-L1-dK: ALLAHALHLLALLALHLAHLALA (SEQ ID NO: 31)

LAH4-L1-dKN: ALLAHALHLLALLALHLAHLALKKA (SEQ ID NO: 32)

LAH4-A4-dKN: ALLHAALAHLLALAHLLALLKKKA (SEQ ID NO: 33)

LAH2-A4: KKALLAAALAALLALAHLLALLKKKA (SEQ ID NO: 34)

25

SEVI: GIHKQKEDSRLQFGGVLVNEILNHMKRATQIPSYKKLIMY (SEQ ID NO: 35)

#### Cultivo de línea celular

30

Se cultivaron células HCT116 derivadas de carcinoma colorrectal humano (CCL-247, ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) y células 293T (Merten et al, 2011) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM+Glutamax, Invitrogen/Gibco, Cergy-Pontoise, Francia) suplementado con un 10% de suero fetal de ternero (FCS) inactivado térmicamente (Invitrogen/Gibco).

#### Producción de vector viral y determinación de título de vector

35

Se generaron vectores lentivirales (LVs) derivados de VIH-1 mediante transfección transitoria de fosfato de calcio de células 293T con cuatro plásmidos: el plásmido vector de transferencia que expresa GFP (pCCLsin-cPPT-hPGK-eGFP-WPRE) (Follenzi et al, 2000), el plásmido que codifica VIH-1 Rev (pK-Rev) (Merten et al, 2011), el plásmido que codifica VIH-1 gagpol (pKLgagpol) (Merten et al, 2011), y la construcción apropiada de glicoproteína de envoltura (GP): pMDG (GP de virus de estomatitis vesicular (Naldini et al, 1996)) para generar VSV-G-LVs; pHCMV-RD114TR (GP de retrovirus endógeno felino modificado (Sandrin et al, 2002) para generar RD114TR-LVs; pBA-Ampho (GP de virus de leucemia de ratón anfotrópica) para generar MLV-A-LVs, pBA\_AcMNPV\_gp64 (GP de baculovirus) para generar GP64-LVs y pBA-GALVanfoKana (GP de virus de leucemia de mono gibón modificado (Sandrin et al, 2002) para generar GALVTR-LVs. Se recolectaron los sobrenadantes virales 48 h post-transfección, se filtraron (0,45 µm), se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C. Los títulos infecciosos se determinaron mediante citometría de flujo (FacsCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) como se ha descrito previamente (Kutner et al, 2009). Resumidamente, se transdijeron células HCT116 con diluciones en serie de reserva de vector, se lavaron y 3 días después se determinaron las eficacias de transducción monitorizando la expresión de GFP. Para la transducción de células hCD34+, el título final se expresó como unidades de transducción por millilitro (TU/mL) y se definió la multiplicidad de infección (MOI). Los títulos de partículas físicas se determinaron midiendo el contenido de cápsida p24 de VIH-1 (ng/mL) usando un kit ELISA comercial (PerkinElmer life science, Boston, MA, EE.UU.).

40

Los sobrenadantes virales de vector retroviral MLV pseudotipado con glicoproteínas de envoltura GALV fueron obtenidos de la línea celular productora PG13-MFG-GFP (Merten 2004).

45

50

### **Transducción de línea celular**

Se llevaron a placa células HCT116 (células 293T para transducción con GP64-LVs) en placas de 12 pocillos ( $10^5$  células/pocillo). Al siguiente día, los LVs fueron incubados en ausencia o en presencia de varias concentraciones de LAH4-L1 (3, 6 ó 12  $\mu$ g/mL) durante 15 minutos a 37°C. A continuación, los LVs fueron cargados sobre monocapas celulares. 6 horas post-transducción, las células fueron lavadas y cultivadas adicionalmente de 2 a 3 días. Se determinaron las eficacias de transducción monitorizando la expresión de GFP usando citometría de flujo.

### **Fuente, cultivo y transducción de células CD34+ humanas**

Se obtuvieron células CD34+ progenitoras de sangre de cordón umbilical mediante selección inmunomagnética (Miltenyi Biotec, París, Francia) a partir de fracciones de células mononucleares de muestras de sangre de cordón obtenidas de alumbramientos sin complicaciones del Hospital Louise Michel, Evry, Francia, cumpliendo la legislación de Bioética Nacional Francesa. En primer lugar, las células hCD34+ fueron pre-activadas durante una noche en medio X-vivo 20 (Lonza, Levallois Perret, Francia) suplementado con citocinas como se ha descrito previamente (Charrier et al, 2011). A continuación, se llevaron a placa células hCD34+ pre-activadas en placas de 48 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo en 100  $\mu$ L de medio de pre-activación). La transducción se completó añadiendo 100  $\mu$ L de sobrenadantes LV pre-incubados 15 minutos a 37°C en ausencia o en presencia de péptidos. 6 h post-transducción, todas las condiciones fueron diluidas a 1 mL con medio de diferenciación (X-Vivo 20 con 50 U/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina y L-glutamina 2 mM (Gibco/Invitrogen), SCF (25 ng/mL), ligando Flt-3 (50 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL) e IL-3 (10 ng/mL) (R&D Systems, Lille, Francia)). 2 días post-transducción, la mita de la suspensión celular fue reemplazada con medio de diferenciación fresco. Se evaluaron las tasas de supervivencia de células descartadas mediante citometría de flujo tras etiquetar con 7-AAD. De 5 a 6 días post-transducción, se evaluó la eficacia de transducción siguiendo el porcentaje de expresión de GFP en la población celular usando citometría de flujo. En el caso de un protocolo de transducción lentiviral llevado a cabo en presencia de Retronectina, usamos el protocolo de precarga dinámica de GALVTR-LVs sobre placas recubiertas de retronectina ( $20 \mu$ g/cm $^2$ ) como se ha descrito previamente (Jacome et al, 2009).

### **Producción y monitorización de ratones HIS (BALB-Rag/ $\gamma$ C)**

Los ratones BALB/c rag2-/–/ $\gamma$ C-/– fueron alojados en condiciones libres de patógenos en Genethon y fueron tratados de acuerdo a las guías del comité ético animal bajo el protocolo CE11003 (fechas de aprobación 03/01/2011-03/01/2012). Resumidamente, se inyectaron células hCD34+ ( $10^5$  células/ratón) transducidas o sin transducir intrahepáticamente en cachorros recién nacidos BALB/c rag2-/–/ $\gamma$ C-/– irradiados. De once a trece semanas post-inyección, los ratones HIS (BALB-Rag/ $\gamma$ C) fueron sometidos a eutanasia y se monitorizó el nivel de injerto eficaz de células hematopoyéticas humanas mediante citometría de flujo en la sangre, el timo, el bazo y la médula ósea.

### **Transfección de línea celular con derivados de LAH4-L1**

Se llevaron a placa células 293T ( $1,5 \times 10^5$ /pocillo) en placas de 48 pocillos el día antes de la transfección. Para la transfección, se mezcló 1  $\mu$ g de pEGFP-C1 con la cantidad deseada de péptido en 50  $\mu$ L de disolución de NaCl 150 mM, se sometió a vórtice y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla ADN/péptido se diluyó en 200  $\mu$ L de DMEM sin FCS y se cargó en monocapas de células. 3 horas post-transfección, el medio fue reemplazado con DMEM que contenía un 10% de FCS. 48 h después, la eficacia de transfección fue estimada monitorizando la expresión de GFP usando citometría de flujo.

## **Resultados y Discusión**

### **Efecto de LAH4-L1 sobre las transducciones de célula diana con LVs prototípico usados en terapia génica.**

Para estudiar el efecto de LAH4-L1 sobre la capacidad de infección de un LV, se transdijeron células HCT116 (o células 293T para GP64-LVs) con GALVTR-LVs, RD114TR-LVs, MLV-A-LVs y VSV-G-LVs (Figura 1A). Tal como se muestra en la Figura 1B, LAH4-L1 promueve la capacidad de infección del LV en diferente grado, observándose el mayor efecto para los GALVTR-LVs. De forma interesante, las partículas de tipo vírico (VLPs), correspondientes a LVs producidos en ausencia de cualquier construcción de glicoproteína de envoltura, son incapaces de transducir células diana, incluso en presencia de LAH4-L1 (Figura 1A). Este resultado indica que la actividad de LAH4-L1 sobre los LVs depende del establecimiento de un mecanismo de entrada a la célula mediado por receptor.

### **Efecto de LAH4-L1 sobre la transducción de progenitores hematopoyéticos humanos con GALVTR-LVs.**

Los GALVTR-LVs se usan habitualmente en protocolos de terapia génica diseñados para ser dirigidos a dianas de progenitores hematopoyéticos humanos (Jacome et al, 2009). Por tanto, se obtuvieron células CD34+ humanas a partir de muestras de sangre de cordón umbilical (UCB) y fueron transducidas con GALVTR-LVs en ausencia o en presencia de diversas concentraciones de LAH4-L1. La concentración óptima de LAH4-L1 necesaria para promover la transducción de células hCD34+ se definió como 12  $\mu$ g/mL (Figura 2A), ligeramente superior a la observada en células HCT116 (Figura 1A). No observamos ningún efecto citotóxico del LAH4-L1 por debajo de 32  $\mu$ g/mL (Figura 2A). Adicionalmente, la transducción de células hCD34+ en presencia de LAH4-L1 aumenta proporcionalmente a la entrada de GALVTR-LV y es reproducible de un donante de UCB a otro (Figura 2B).

**Monitorización de ratones HIS (BALB-rag/ $\gamma$ C) con injertos de células hCD34+ transducidas con GALVTR-LV: evaluación de la seguridad del péptido LAH4-L1.**

El uso de ratones inmunodeficientes BALB/c rag2-/- $\gamma$ C-/- recién nacidos para la inyección de células hCD34+ da lugar a una reconstitución robusta del sistema inmune humano. Los animales resultantes son denominados ratones de “Sistema Inmune Humano” (HIS) (BALB-Rag/ $\gamma$ C) (Legrand et al, 2008). Este modelo animal es útil para la evaluación de la seguridad de compuestos que han estado en contacto con progenitores hematopoyéticos. Por tanto, decidimos estudiar la calidad del injerto de células hematopoyéticas en el modelo rag2-/- $\gamma$ C-/- para células hCD34+ que han sido transducidas con GALVTR-LVs en presencia de LAH4-L1 o de Retronectina como control. Tal como se muestra en la Figura 3A, doce semanas después de la inyección en ratones rag2-/- $\gamma$ C-/-, las células CD45+ humanas, transducidas en presencia de LAH4-L1 o Retronectina, son fácilmente detectables en la sangre, la médula ósea (BM), el bazo y el timo. Para excluir cualquier efecto citotóxico o negativo del LAH4-L1 sobre la población celular humana total, se monitorizó el nivel de injerto efectivo en ratones HIS (BALB-Rag/ $\gamma$ C) para células humanas no transducidas (Figuras 3B-D-F) y también para células humanas transducidas (Figuras 3C-E-G). Tal como se muestra en las Figuras 3B y 3C, todos los ratones exhibieron timopoyesis humana en el timo, como evidencian los porcentajes de expresión de TCR $\alpha$ / $\beta$  humano, células T humanas doble-positivas CD4/CD8 y positivas individuales CD4 y CD8 (Figuras 3B-C). El bazo y la BM de los ratones (Figuras 3D a 3G) contenían una población grande de células CD19+ humanas que indican un desarrollo activo de linfoides B humanos, así como una población de monocitos humanos y células asesinas naturales. Los progenitores hematopoyéticos humanos (células hCD34+ y hCD45+) también son detectables en la BM (Figuras 3F-G). En conjunto, no observamos ningún efecto citotóxico o negativo del LAH4-L1 sobre la reconstitución del sistema inmune humano en estos ratones. Observamos un desarrollo normal de los diferentes subconjuntos de células del sistema inmune humano, tanto en células transducidas como no transducidas, lo que indica que el LAH4-L1 es un aditivo de cultivo seguro y eficaz.

**Estudios de función estructural de LAH4-L1.**

Se han sintetizado derivados de LAH4-L1 para entender mejor la función específica de los residuos de lisina e histidina a la hora de potenciar la capacidad de infección del LV (Figura 4A). Tal como se muestra en la Figura 4B, la sustitución de los cuatro residuos de histidina por 4 residuos de lisina (LAK4-L1) es perjudicial para la mejoría de la transducción de células CD34+ con GALVTR-LVs pero no es debido a un fuerte efecto citotóxico (Figura 4C). En nuestras condiciones de cultivo a pH neutro, los residuos de histidina del LAH4-L1 no están protonados, lo que permite que el LAH4-L1 adopte una orientación transmembrana. Mientras que en el LAK4-L1 los residuos de lisina a lo largo de todo el péptido están protonados a pH neutro, lo que seguramente hace que éste no adopte una orientación transmembrana. Además, el LAK4-L1 es ineficaz a pesar de la presencia de nueve cargas catiónicas a pH neutro. Esto sugiere con rotundidad que el LAH4-L1 actúa a través de un mecanismo molecular que no puede estar restringido exclusivamente a la neutralización de cargas repulsivas en la superficie viral y de membrana celular.

A continuación, centramos nuestra atención en los dos residuos de lisina presentes en ambos extremos del LAH4-L1. La sustitución de los cuatro residuos de lisina por cuatro residuos de arginina (LAH4-L1-R) no presenta un efecto negativo. El LAH4-L1-R es tan eficaz como el LAH4-L1 para promover la transducción de células hCD34+ con GALVTR-LVs (Figura 4B), sin citotoxicidad aparente (Figura 4C). Por el contrario, la sustitución de los cuatro residuos de lisina por residuos de histidina (LAH8-L1) es perjudicial. Por lo tanto, la presencia de cargas catiónicas a pH neutro (lisina o arginina) parece necesaria para potenciar la capacidad de infección de LV. Para determinar cuáles de los residuos de lisina son cruciales, los del extremo N-terminal o los del C-terminal, se diseñaron tres derivados de LAH4-L1 (Figura 4A): LAH4-L1-dK (no lisina), LAH4-L1-dKN (eliminación de los residuos de lisina N-terminales) y LAH4-L1-dKC (eliminación de los residuos de lisina C-terminales). Tal como se muestra en la Figura 4B, la transducción de células hCD34+ con GALVTR-LV no es detectable en presencia de LAH4-L1-dK y LAH4-L1-dKN. La ausencia de residuos de lisina en el extremo N-terminal del LAH4-L1 es perjudicial. Por el contrario, LAH4-L1-dKC promueve la transducción de células hCD34+ tan eficazmente como LAH4-L1.

Para definir si se pueden usar aminoácidos D en lugar de aminoácidos L, se sintetizó un péptido LAH4-L1 con aminoácidos D (D-LAH4-L1). Tal como se muestra en la Figura 4B, D-LAH4-L1 sigue promoviendo la transducción lentiviral, aunque con una menor eficacia (43%) que LAH4-L1.

**50 Diseño y evaluación de isómeros de LAH4-L1 que albergan residuos de leucina o alanina entre el ángulo (de 60° a 180°) comprendido entre los residuos de histidina en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson.**

Se ha preparado una serie de péptidos isómeros de LAH4-L1 (Figuras 5A y D). La primera característica de estos isómeros de LAH4-L1 es la diferencia en el ángulo comprendido por los residuos de histidina (de 60 a 180°) cuando el péptido adopta una conformación de hélice  $\alpha$  a pH neutro (Figuras 5B y E). La segunda característica es la elección de residuos de aminoácido localizados entre los dos pares de residuos de histidina adyacentes cuando el péptido adopta una conformación de hélice  $\alpha$ . Estos residuos consisten en residuos de leucina para serie L (Figura 5B) y en residuos de alanina para la serie A (Figura 5E). Por consiguiente, la nomenclatura de péptido refleja el número de residuos de alanina o de leucina que están presentes entre los dos pares de residuos de histidina adyacentes en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson. Por ejemplo, el péptido denominado LAH4-A4 es

el péptido que alberga cuatro residuos de alanina entre los dos pares de residuos de histidina adyacentes que producen un ángulo hidrofílico de 140° (Figura 5E). Todos estos péptidos han sido evaluados en relación a su capacidad para promover la transducción de células hCD34+ con GALVTR-LVs. Cabe destacar, en las series L y A, que los péptidos más eficaces albergan un ángulo hidrofílico de 140°, esto es LAH4-L4 y LAH4-A4. LAH4-A5, con un ángulo hidrofílico de 160°, también es altamente eficaz. Estos datos han sido confirmados con curvas de dosis-respuesta (Figura 6A). Para una concentración de 3 y 6 µg/mL, el LAH4-A4 es aproximadamente cuatro veces más eficaz que LAH4-L1 sin citotoxicidad aparente (Figura 6B).

#### **Estudios de función estructural de LAH4-A4.**

Para estudiar la función de los residuos de histidina, se diseñaron tres derivados de LAH4-A4 (Figura 7A): LAH2-A4, que alberga solo dos residuos de histidina, que definen un ángulo hidrofílico de 100° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson (Figura 7B); LAH2-A6, que alberga solo dos residuos de histidina, que definen un ángulo hidrofílico de 140° (Figura 7B) y K2-L10-A12-K2, un péptido helicoidal apolar con residuos de lisina en cada extremo de la hélice. Este péptido corresponde a un LAH4-A4 en el que todos los residuos de histidina han sido reemplazados por residuos de alanina (Figura 7A). Tal como se muestra en la Figura 6C, LAH2-A6 promueve la transducción de células hCD34+ con GALVTR-LV de forma tan eficaz como el LAH4-A4, sin citotoxicidad aparente (Figura 7D). Por el contrario, LAH2-A4 no es funcional. Este péptido alberga un ángulo no óptimo (100°) comprendido entre los dos residuos de histidina en la representación de rueda de Edmundson (Figura 7B). Cabe destacar que el péptido K2-L10A12-K2 promueve un 17% el nivel de transducción de hCD34+ respecto al LAH4-A4. Por tanto, los residuos de histidina mejoran la eficacia del péptido LAH4-A4 pero no son estrictamente necesarios para promover la transducción lentiviral.

Para definir mejor la función de los residuos de lisina, tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal de LAH4-A4, se diseñaron cuatro derivados de LAH4-A4 (Figura 8A): LAH4-A4-dKN (eliminación de los residuos de lisina N-terminales), LAH4-A4-K1N (eliminación de solo un residuo de lisina N-terminal), LAH4-A4-K3N (sustitución de la alanina de la posición 3 por una lisina) y LAH4-A4-dKC (eliminación de los residuos de lisina C-terminales). En presencia de LAH4-A4-dKN, la transducción de células hCD34+ con GALVTR-LVs no es detectable (Figura 8B). Esta ausencia de transducción no es la consecuencia de un fuerte efecto citotóxico (Figura 8C). La presencia de solo un residuo de lisina ubicado en el extremo N-terminal de LAH4-A4-K1N es suficiente para restaurar el 60% del nivel de transducción de hCD34+ respecto a LAH4-A4. Además, el efecto del LAH4-A4 no se ve mejorado por la adición de una lisina extra en el extremo N-terminal. De hecho, LAH4-A4-K3N no es tan eficaz como LAH4-A4 (Figura 8B).

Para definir la secuencia activa mínima en LAH4-A4, se diseñaron péptidos más cortos (Figura 9A). Tal como se muestra en la Figura 9B, la eliminación de la alanina C-terminal (LAH4-A4-d1aa) disminuye ligeramente la eficacia del LAH4-A4. La eliminación de un residuo de aminoácido en ambos lados del péptido (LAH4-A4-d2aa) reduce la eficacia al 30% en comparación con el LAH4-A4. Finalmente, la eliminación de 2 residuos de aminoácido en el la C-terminal (LAH4-A4-d2Caa) o de 3 residuos de aminoácido (LAH4-A4-d3aa) o de 5 residuos de aminoácido (LAH4-A4-d5aa) disminuye la eficacia por debajo del 15% en comparación con el LAH4-A4. En conclusión, un pequeño acortamiento de la longitud del péptido LAH4-A4 es perjudicial para la promoción de la transducción lentiviral de células hCD34+.

Para determinar si los 4 residuos de alanina que definen el LAH4-A4 son los únicos 4 residuos de alanina necesarios para definir la potencia del LAH4-A4, se han reemplazado todos los demás residuos de alanina (posiciones 3, 8, 16 y 26) incluidos en el LAH4-A4 por residuos de leucina (LAH4-A4-Leu). Este péptido sigue siendo activo pero es dos veces menos potente que el LAH4-A4 (Figura 9B).

A continuación, para determinar si la estructura helicoidal de los derivados de LAH4 es crucial para promover la transducción lentiviral, se ha diseñado un péptido que alberga una prolina en el medio de la hélice (posición 14) (LAH4-A4-P14). Tal como se muestra en la Figura 9B, la inserción de la prolina rompedora de la hélice elimina el 80% de la transducción lentiviral, lo que sugiere un papel crucial de la estructura de hélice del LAH4-A4 en la promoción de la transducción lentiviral.

Puesto que todos los derivados de LAH4 evaluados están amidados, se ha sintetizado un péptido LAH4-A4 sin amidación (LAH4-A4-dNH2). Tal como se muestra en la Figura 9B, el LAH4-A4 amidado es aproximadamente dos veces más eficiente que en ausencia de amidación.

En 2007, se aisló del semen un fragmento de la fosfatasa ácida prostática humana (los residuos de aminoácido 240 a 290), identificado como un fuerte potenciador de la capacidad de infección del VIH-1 (Munch et al., 2007). Este péptido denominado SEVI (potenciador de infección vírica de semen humano, del inglés “Semen Enhancer of Viral Infection”) es capaz de promover la transducción de vectores lentivirales (Wurm et al., 2010). Evaluamos la capacidad de SEVI y LAH4-A4 para promover la transducción de células hCD34+ con GALVTR-LV. Se han usado los péptidos LAH4-A4 o SEVI a la misma molaridad de 2,2 µM. Tal como se muestra en la Figura 10A, los datos obtenidos de tres donantes de sangre de cordón diferentes indican que la transducción en presencia de LAH4-A4 es más eficaz que en presencia de SEVI, sin citotoxicidad aparente dos días post-transducción (Figura 10B).

Los derivados de LAH4 han sido descritos previamente como agentes de transfección de ADN (Kichler et al, 2003). Por lo tanto, evaluamos la capacidad de LAH4-A4 para transfectar células 293T con un plásmido que expresa la proteína GFP. Tal como se muestra en la Figura 11, 12 µg/mL de LAH4-A4 no son suficientes para promover eficazmente la transfección de células 293T. Sin embargo, un aumento en la concentración de LAH4-A4 a 24 µg/mL permite una transfección altamente eficaz de células 293T, tal como se ha observado para el péptido de control LAH4-L1. De forma interesante, a la misma concentración de 24 µg/mL, el K2-L10A12-K2 es incapaz de promover la transfección celular. La ausencia de residuos de histidina es perjudicial para dicha actividad, mientras que simultáneamente, solo 12 µg/mL de K2-L10A12-K2 siguen siendo capaces de promover algo de transducción lentiviral en comparación con LAH4-A4 (Figura 7B).

**10 Efecto de LAH4-L1, LAH4-L4<sub>iso</sub>, LAH4-A4 y LAH4-A5 en la transducción de progenitores hematopoyéticos humanos con RD114TR-LVs o GALV-MLV.**

15 Se obtuvieron células CD34+ humanas de muestras de sangre de cordón umbilical (UCB) y fueron transducidas con RD114TR-LV (3,8x10E6 TU/mL) o GALVTR-MLV (5x10E5 TU/mL) que portaban un gen indicador GFP, en ausencia o en presencia de 12 µg/mL de LAH4-L1, LAH4-L4<sub>iso</sub>, LAH4-A4 o LAH4-A5. No observamos ningún efecto citotóxico de los péptidos y todos ellos promovieron la entrada de ambos virus (Figura 12). El péptido LAH4-A4 fue el más eficaz. El experimento con el virus GALVTR-MLV demuestra que la infección mejora incluso con un genoma viral diferente al del VIH.

Referencias

- 20 Bechinger B. 1996. Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *J. Mol. Biol.* 263: 768-75.
- Charrier, S., M. Ferrand, M. Zerbato, G. Précigout, A. Viorney, S. Bucher-Laurent, S. Benkhelifa-Ziyyat, O.W. Merten, J. Perea, y A. Galy. 2011. Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther.* 18: 479-487.
- 25 Davis, H. E., M. Rosinski, J. R. Morgan, y M. L. Yarmush. 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.* 86: 1234-42.
- D'Costa, J., S. G. Mansfield, y L. M. Humeau. 2009. Lentiviral vectors in clinical trials: Current Status. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11: 554-64.
- Follenzi, A., L. E. Ailles, S. Bakovic, M. Geuna, y L. Naldini. 2000. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by 30 nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat. Genet.* 25: 217-222.
- Georgescu J., V.H.O. Munhoz, y B. Bechinger. 2010. NMR structures of the histidine-rich peptide LAH4 in micellar environments: Membrane insertion, pH-dependent mode of antimicrobial action, and transfection. *Biophys. J.* 99:2507-15.
- Jacome, A., S. Navarro, P. Río, R. M. Yañez, A. González-Murillo, M. L. Lozano, M. L. Lamana, J. Sevilla, T. Olive, C. Diaz-Heredia, I. Badell, J. Estella, L. Madero, G. Guenechea, J. Casado, J. C. Segovia, y J. A. Bueren. 2009. Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol. Ther.* 17: 1083-92.
- Kichler, A., C. Leborgne, J. März, O. Danos y B. Bechinger. 2003. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 1564-68.
- 40 Kutner, R.H., X. Y. Zhang, y J. Reiser. 2009. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 4: 495-505.
- Kyte, J. y R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- 45 Legrand, N., K. Weijer, y H. Spits. 2008. Experimental model for the study of the human immune system: production and monitoring of "Human Immune System" Rag2-/-gamma C-/c mice. *Methods Mol. Biol.* 415: 65-82.
- Mason, A. J., W. Moussaoui, T. Abdelrahman, A. Boukhari, P. Bertani, A. Marquette, P. Shooshtariyahed, G. Moulay, N. Boehm, B. Guerold, R. J. Sawers, A. Kichler, M. H. Metz-Boutique, E. Candolfi, G. Prévost, y B. Bechinger. 2009. Structural determinants of antimicrobial and antiplasmoidal activity and selectivity in histidine-rich amphipathic cationic peptides. *J. Biol. Chem.* 284: 119-33.
- 50 Merten, O. W., S. Charrier, N. Laroudie, S. Fauchille, C. Dugué, C. Jenny, M. Audit, M. A. Zanta-Boussif, H. Chautard, M. Radizzani, G. Vallanti, L. Naldini, P. Noguiez-Hellin, y A. Galy. 2011. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Hum. Gene Ther.* 22: 343-56.

- Merten, O.W. 2004. State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J. Gene Med.* 6 Suppl 1, S105-124.

Munch, J., E. Rucker, L. Standker, K. Adermann, C. Goffinet, M. Schindler, S. Wildum, R. Chinnadurai, D. Rajan, A. Specht, G. Gimenez-Gallego, P. C. Sanchez, D. M. Fowler, A. Koulov, J. W. Kelly, W. Mothes, J. C. Grivel, L. Margolis, O. T. Keppler, W. G. Forssmann, y F. Kirchhoff. 2007. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131: 1059-71.

Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, y D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 272: 263-7.

Novelli, EM., L. Cheng, Y. Yang, W. Leung, M. Ramirez, V. Tanavde, C. Enger, y C. I. Civin. 1999. Ex vivo culture of cord blood CD34+ cells expands progenitor cell numbers, preserves engraftment capacity in nonobese diabetic/sever combined immunodeficient mice, and enhances retroviral transduction efficiency. *Hum. Gene Ther.* 10: 2927-40.

Pollok, K. E., y D. A. Williams. 1999. Facilitation of retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem and progenitor cells and peripheral blood T-lymphocytes utilizing recombinant fibronectin fragments. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 595-604.

Roan, N. R., J. Munch, N. Arhel, W. Mothes, J. Neidleman, A. Kobayashi, K. Smith-McCune, F. Kirchhoff, y W. C. Greene. 2009. The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 83: 73-80.

Rodrigues, T., M. J. Carrondo, P. M. Alves, y P. E. Cruz. 2007. Purification of retroviral vectors for clinical application: biological implications and technological challenges. *J. Biotechnol.* 127: 520-41.

Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, D. Trono, y F. L. Cosset. 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100: 823-32.

Schiffer, M. y A. B. Edmundson. 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7: 121-35.

Wurm, M., A. Schambach, D. Lindemann, H. Hanenberg, L. Ständker, W. Forssmann, R. Blasczyk y P. A. Horn. 2010. The influence of semen-derived enhancer of virus infection on the efficiency of retroviral gene transfer. *J. Gen. Med.* 12: 137-46.

**Lista de secuencias**

<110> GENETHON

<120> Péptidos con propiedades potenciadoras de infección vírica y su uso

<130> B1211PC00

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> LAH4

<400> 1  
Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu His His Leu Ala His Leu Ala  
1 5 10 15

Leu His Leu Ala Leu Ala Lys Lys Ala  
20 25

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> LAH4-L1 (todos aminoácidos L o todos aminoácidos D)

<400> 2

Lys Lys Ala Leu Leu Ala His Ala Leu His Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Leu His Leu Ala His Ala Leu Lys Lys Ala  
20 25

10 <210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> LAH4-L1-dKC

<400> 3

Lys Lys Ala Leu Leu Ala His Ala Leu His Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Leu His Leu Ala His Ala Leu Ala  
20

20

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> LAH4-L1-R

30

<400> 4

Arg Arg Ala Leu Leu Ala His Ala Leu His Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Leu His Leu Ala His Ala Leu Arg Arg Ala  
20 25

35 <210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> artificial

40 <220>

<223> LAH4-L0

<400> 5

Lys Lys Ala Leu Leu Ala His Ala Leu Ala His Leu Ala Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Leu His Leu Ala Leu His Leu Lys Lys Ala  
20 25

45

<210> 6

<211> 26

<212> PRT  
 <213> artificial

5    <220>  
     <223> LAH4-L2

<400> 6  
 Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala His His Leu Ala Leu Leu Ala  
 1                5                10                15

Leu His Leu Ala His Ala Leu Lys Lys Ala  
 20                25

10      <210> 7  
       <211> 26  
       <212> PRT  
       <213> artificial

15      <220>  
     <223> LAH4-L3

<400> 7  
 Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala His His Leu Ala Leu Leu Ala  
 1                5                10                15

His His Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala  
 20                25

20      <210> 8  
       <211> 26  
 25      <212> PRT  
       <213> artificial

<220>  
   <223> LAH4-L4iso

30      <400> 8  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Leu Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Leu Ala  
 1                5                10                15

His His Leu Ala Leu Ala Leu Lys Lys Ala  
 20                25

35      <210> 9  
       <211> 26  
       <212> PRT  
       <213> artificial

40      <220>  
     <223> LAH4-L5

<400> 9  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Leu Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Leu Ala  
 1                5                10                15

His Leu Ala Ala Leu His Leu Lys Lys Ala  
 20                25

45      <210> 10  
       <211> 26

<212> PRT  
<213> artificial

5 <220>  
<223> LAH4-L6iso

<400> 10  
Lys Lys Ala Leu Leu His Leu Ala Leu Leu Ala Ala Ala Leu His Ala  
1 5 10 15

His Leu Ala Ala Leu His Leu Lys Lys Ala  
20 25

10 <210> 11  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> LAH4-A1

<400> 11  
Lys Lys Ala Leu Leu Ala His Ala Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Leu His Leu Ala His Leu Leu Lys Lys Ala  
20 25

20 <210> 12  
<211> 26  
25 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> LAH4-A2

30 <400> 12  
Lys Lys Ala Leu Leu Ala Ala Leu His His Leu Ala Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Leu His Leu Ala His Leu Leu Lys Lys Ala  
20 25

35 <210> 13  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> artificial

40 <220>  
<223> LAH4-A3

<400> 13  
Lys Lys Ala Leu Leu Ala Ala Leu His His Leu Leu Ala Leu Ala  
1 5 10 15

His His Leu Ala Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
20 25

45 <210> 14  
<211> 26

<212> PRT  
 <213> artificial

5      <220>  
       <223> LAH4-A4

<400> 14  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala  
 1                5                10                15

His His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
 10              20              25

15      <210> 15  
       <211> 26  
       <212> PRT  
       <213> artificial

20      <220>  
       <223> LAH4-A5

<400> 15  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Leu Leu Ala His Leu Ala Ala Leu Leu  
 1                5                10                15

His Ala Leu Leu Ala His Leu Lys Lys Ala  
 20              25

25      <210> 16  
       <211> 26  
       <212> PRT  
       <213> artificial

30      <220>  
       <223> LAH4-A6iso

<400> 16  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala His Leu  
 1                5                10                15

His Ala Leu Leu Ala His Leu Lys Lys Ala  
 20              25

35      <210> 17  
       <211> 25  
       <212> PRT  
 40      <213> artificial

<220>  
 <223> LAH4-A4-K1N

45      <400> 17  
 Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala His  
 1                5                10                15

His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
 20              25

50      <210> 18  
       <211> 26  
       <212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> LAH4-A4-K3N

<400> 18  
 Lys Lys Lys Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

His His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
 20 25

10 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> LAH4-A4-dKC

<400> 19  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

His His Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
 20

20 <210> 20  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial

<220>  
 <223> LAH4-A4-d1aa

30 <400> 20  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

His His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys  
 20 25

35 <210> 21  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 40 <223> LAH4-A4-d2aa

<400> 21  
 Lys Lys Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala His  
 1 5 10 15

His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys  
 20

45 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> PRT

<213> artificial

<220>

5 <223> LAH4-A4-d2Caa

<400> 22  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

His His Leu Leu Ala Leu Lys Lys  
 20

10 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> LAH4-A4-d3aa

<400> 23  
 Lys Lys Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala His His  
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys  
 20

20 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial

<220>  
 <223> LAH4-A4-d5aa

30 <400> 24  
 Lys Lys Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala His His  
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Lys Lys  
 20

35 <210> 25  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <223> LAH2-A6

<400> 25  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
 45 20 25

<210> 26

<211> 26  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> K2-L10A12-K2

<400> 26  
 Lys Lys Ala Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
 20 25

10  
 15 <210> 27  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> LAH4-A4-Leu

20 <400> 27  
 Lys Lys Leu Leu Leu His Ala Leu Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15

His His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Leu  
 20 25

25 <210> 28  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> LAH4-A4-P14

<400> 28  
 Lys Lys Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Pro Leu Ala  
 1 5 10 15

His His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
 20 25

35 <210> 29  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <223> LAK4-L1

<400> 29  
 Lys Lys Ala Leu Leu Ala Lys Ala Leu Lys Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

45 Leu Lys Leu Ala Lys Ala Leu Lys Lys Ala  
 20 25

<210> 30

<211> 26  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> LAH8-L1

<400> 30  
 His His Ala Leu Leu Ala His Ala Leu His Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu His Leu Ala His Ala Leu His His Ala  
 10 20 25

<210> 31  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial

<220>  
 <223> LAH4-L1-dK

20 <400> 31  
 Ala Leu Leu Ala His Ala Leu His Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu His  
 1 5 10 15

Leu Ala His Ala Leu Ala  
 20

25 <210> 32  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> LAH4-L1-dKN

<400> 32  
 Ala Leu Leu Ala His Ala Leu His Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu His  
 1 5 10 15

Leu Ala His Ala Leu Lys Lys Ala

35 20  
 35

40 <210> 33  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> LAH4-A4-dKN

<400> 33  
 Ala Leu Leu His Ala Ala Leu Ala His Leu Leu Ala Leu Ala His His  
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
 20

5      <210> 34  
       <211> 26  
       <212> PRT  
       <213> artificial  
  
 10     <220>  
       <223> LAH2-A4  
  
 10     <400> 34  
       Lys Lys Ala Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ala  
       1                5                10                15  
  
       His His Leu Leu Ala Leu Leu Lys Lys Ala  
       20                25  
  
 15     <210> 35  
       <211> 39  
       <212> PRT  
       <213> artificial  
  
 20     <220>  
       <223> SEVI  
  
       <400> 35  
       Gly Ile His Lys Gln Lys Glu Lys Ser Arg Leu Gln Gly Gly Val Leu  
       1                5                10                15  
  
       Val Asn Glu Ile Leu Asn His Met Lys Arg Ala Thr Gln Ile Pro Ser  
       20                25                30  
  
       Tyr Lys Lys Leu Ile Met Tyr  
       35  
 25  
  
 30     <210> 36  
       <211> 26  
       <212> PRT  
       <213> artificial  
  
       <220>  
       <223> LAH4-L4  
  
 35     <400> 36  
       Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala His His Leu Ala Leu Leu Ala  
       1                5                10                15  
  
       His Leu Leu Ala Leu His Leu Lys Lys Ala  
       20                25  
  
 40     <210> 37  
       <211> 27  
       <212> PRT  
       <213> artificial  
  
 45     <220>  
       <223> LAH4-L6  
  
       <400> 37

ES 2 639 307 T3

Lys Lys Lys Lys Ala Leu Leu His Leu His Leu Ala Leu His Leu  
1                5                10                15

His Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Lys Lys Lys  
20                25

## REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* o *ex vivo* del péptido LAH4 que tiene la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1 o de un derivado funcional del mismo que presente la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral, para promover la infección de una célula eucariótica por un virus o un vector viral, en donde el derivado funcional comprende

- 5 - 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos;  
 - su extremo N-terminal comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4, seleccionados en particular entre lisinas y/o argininas; y  
 - una región helicoidal central seleccionada del grupo que consiste en

10 a) una hélice apolar que alberga un grupo de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un lado de la hélice y residuos de alanina consecutivos en el otro lado de la hélice, definiendo dichos residuos de alanina consecutivos un ángulo de 60 a 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, y preferiblemente un ángulo de 140°; o

15 b) una hélice anfipática que alberga un conjunto de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un lado de la hélice y de dos a cuatro residuos de histidina en el otro lado de la hélice, que definen un ángulo hidrofílico comprendido entre 60° y 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson y preferiblemente un ángulo de 140°.

20 2. El uso según la reivindicación 1, en donde el extremo N-terminal del péptido comprende una o dos carga(s) positiva(s) proporcionada(s) por residuo(s) de arginina o lisina, en particular en donde los residuos cargados positivamente son los residuos más N-terminales.

25 3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido comprende un extremo C-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4 proporcionados por residuos de arginina y/o lisina.

4. El según la reivindicación 3, en donde:

30 - el residuo más C-terminal es una alanina y en donde los residuos de aminoácido cargados positivamente del extremo C-terminal del péptido se encuentran contiguos a la alanina C-terminal; o  
 - el residuo(s) más C-terminal es(son) uno o dos aminoácido(s) cargado(s) positivamente.

35 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la región helicoidal central es una hélice anfipática como se ha definido en b) y en donde en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson dicho péptido comprende solo residuos de leucina o solo de alanina entre los residuos de histidina en el ángulo más pequeño definido por dichos residuos de histidina.

40 6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el péptido se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 27.

7. Un péptido anfipático catiónico que es un derivado funcional del péptido LAH4 de la SEQ ID NO: 1, en donde el derivado funcional tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral, que comprende

- 35 - 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos;  
 - un extremo N-terminal que comprende de uno a tres residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4;  
 - al menos dos residuos de histidina, preferiblemente dos pares de residuos de histidina, que definen un ángulo hidrofílico comprendido entre 80° y 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson,  
 - siendo seleccionados los otros aminoácidos del péptido entre residuos de alanina y leucina;

en donde en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson dicho péptido comprende solo residuos de alanina entre los residuos de histidina más distantes en el ángulo más pequeño definido por dichos residuos de histidina.

45 8. El péptido según la reivindicación 7, en donde el extremo N-terminal comprende uno o dos residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4.

9. El péptido según la reivindicación 7 u 8, en donde dicho ángulo hidrofílico está comprendido entre 120 y 180°, y preferiblemente donde dicho ángulo es de 140°.

50 10. Un péptido que es un derivado funcional del péptido LAH4, en donde el péptido LAH4 tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y en donde el derivado funcional tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral, que comprende:

- 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos;

- 5            - un extremo N-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4; y  
           - una hélice apolar que alberga un grupo de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un la do de la hélice y residuos de alanina consecutivos en el otro lado de la hélice, que definen un ángulo de 60 a 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, y preferiblemente un ángulo 140°.

**11.** Un péptido anfipático catiónico que es un derivado funcional de LAH4, en donde el derivado funcional de LAH4 tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o de un vector viral, que comprende

- 10            - 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos;  
           - un extremo N-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4;  
           - al menos dos residuos de histidina, en particular cuatro residuos de histidina, que definen un ángulo hidrofílico comprendido entre 140° y 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, más específicamente un ángulo de 140°;

15            en donde en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson dicho péptido comprende solo residuos de leucina entre los residuos de histidina más distantes en el ángulo más pequeño definido por dichos residuos de histidina,

excepto los péptidos que consisten en las secuencias KKALLALALHHLALLAHLLALHLKKA (SEQ ID NO: 36) y KKKKALLHLHLLALHLHILLALLALKKK (SEQ ID NO: 37).

**12.** Un péptido según la reivindicación 11, que es un isómero del péptido LAH4 de la SEQ ID NO: 1, cuya secuencia de aminoácidos consiste en 8 residuos de alanina, 4 de histidina, 10 de leucina y 4 de lisina.

20            **13.** Un péptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8-27.

**14.** Un método *in vitro* o *ex vivo* para infectar células eucarióticas con un virus o un vector viral, que comprende poner en contacto las células con el virus o el vector viral en presencia del péptido LAH4 de la SEQ ID NO: 1 o con un derivado funcional del mismo como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las células preferiblemente son células madre/progenitoras hematopoyéticas, en particular células CD34+, más particularmente células CD34+ humanas.

**15.** Un método *in vivo* o *ex vivo* para aumentar la eficacia de una transferencia de ácido nucleico al interior de una célula diana con un vector viral, que comprende poner en contacto la célula diana con el vector viral en presencia del péptido LAH4 de la SEQ ID NO: 1 o de un derivado funcional del mismo como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para promover la transferencia de un ácido nucleico (tal como un gen(es), cADNs, siARNs, shARN, secuencia de oligonucleótidos antisentido) al interior de una célula diana, en donde las células preferiblemente son células madre/progenitoras hematopoyéticas, en particular células CD34+, más particularmente células CD34+ humanas.

**16.** Un método para diagnosticar una infección por un virus en un sujeto, que comprende incubar una muestra del sujeto con una célula eucariótica y el péptido LAH4 de la SEQ ID NO: 1 o con un derivado funcional del mismo según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, a fin de amplificar cualquier virus contenido en dicha muestra, e identificar el virus amplificado.

**17.** El péptido según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, para uso en terapia génica para promover la infección de una célula eucariótica por parte de un virus o un vector viral, o para uso en combinación con un virus o vector viral en terapia génica.

**18.** Un péptido LAH4 que tiene la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1 o un derivado funcional del mismo que tiene la capacidad de mejorar la eficacia de transducción de un virus o vector viral, en donde el derivado funcional comprende

- 45            - 19 o más aminoácidos, en particular 20, 21 o más aminoácidos;  
           - su extremo N-terminal comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4, seleccionados en particular entre lisinas y/o argininas; y  
           - una región helicoidal central seleccionada del grupo que consiste en  
               a) una hélice apolar que alberga un grupo de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un lado de la hélice y residuos de alanina consecutivos en el otro lado de la hélice, definiendo dichos residuos de alanina consecutivos un ángulo de 60 a 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson, y preferiblemente un ángulo de 140°; o  
               b) una hélice anfipática que alberga un conjunto de residuos de aminoácido hidrofóbicos en un lado de la hélice y de dos a cuatro residuos de histidina en el otro lado de la hélice, que definen un ángulo hidrofílico comprendido entre 60° y 180° en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson y preferiblemente un ángulo de 140°,

para uso en terapia génica para promover la infección de una célula eucariótica por parte de un virus o vector viral, o para uso en combinación con un virus o un vector viral en terapia génica.

5       **19.** El péptido LAH4 o un derivado funcional del mismo para uso según la reivindicación 18, en donde el extremo N-terminal del péptido comprende una o dos carga(s) positiva(s) proporcionada(s) por el residuo(s) de arginina o lisina, en particular en donde los residuos cargados positivamente son los residuos más N-terminales.

**20.** El péptido LAH4 o el derivado funcional para uso según la reivindicación 18 o 19, en donde el péptido comprende un extremo C-terminal que comprende uno o más residuos de aminoácido cargados positivamente a pH 7,4 proporcionados por residuos de arginina y/o lisina.

**21.** El péptido LAH4 o el derivado funcional para uso según la reivindicación 20, en donde:

- 10      - el residuo más C-terminal es una alanina y en donde los residuos de aminoácido cargados positivamente en el extremo C-terminal del péptido están contiguos a la alanina C-terminal; o  
- el(los) residuo(s) más C-terminal(es) es(son) uno o dos aminoácido(s) cargado(s) positivamente.

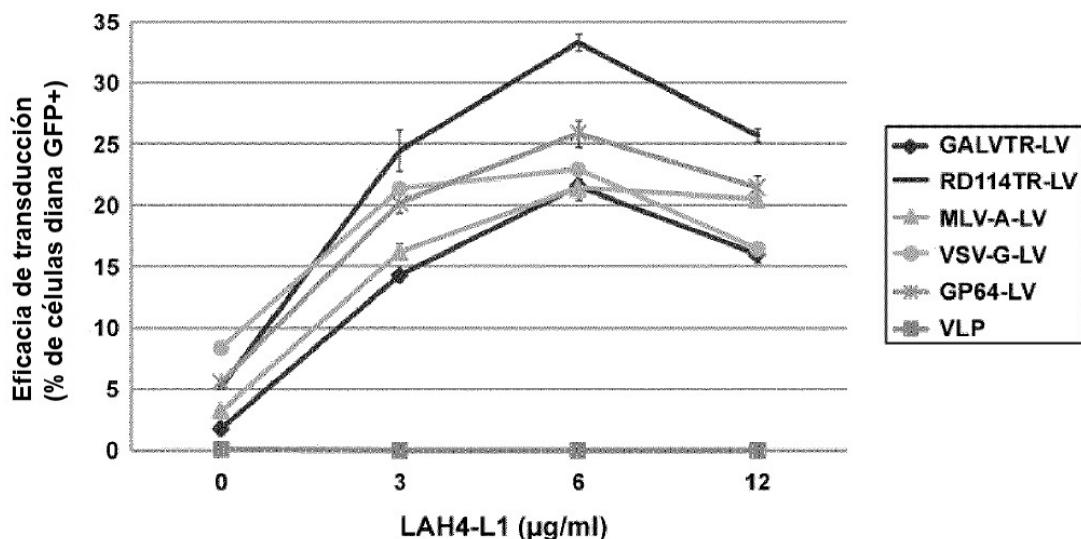
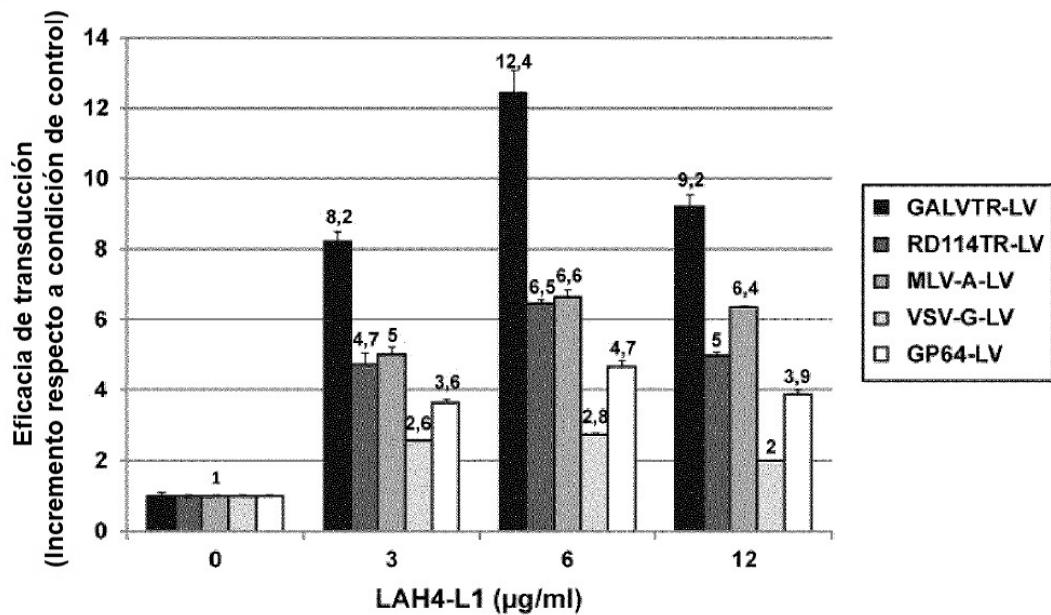
15       **22.** El péptido LAH4 o el derivado funcional para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde la región helicoidal central es una hélice anfipática como se define en b) y en donde en la representación de rueda de Schiffer-Edmundson dicho péptido comprende solo residuos de leucina o solo residuos de alanina entre los residuos de histidina en el ángulo más pequeño definido por dichos residuos de histidina.

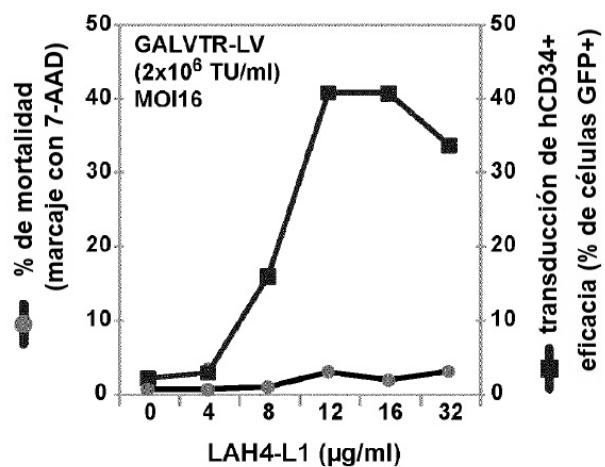
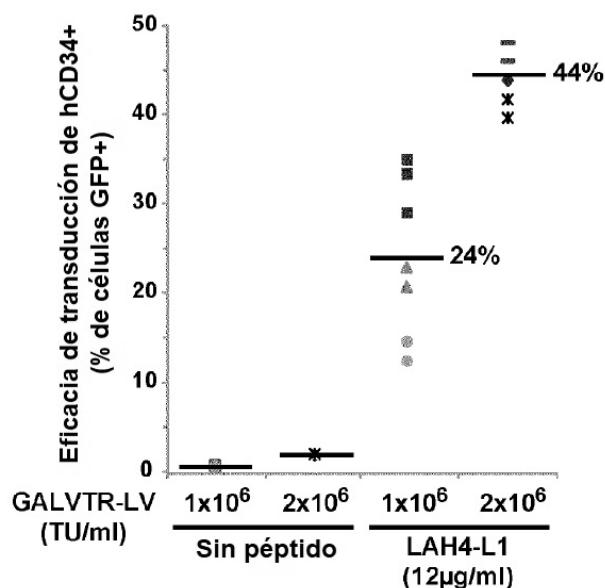
**23.** El péptido LAH4 o un derivado funcional para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en donde el péptido se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1 a 27.

20       **24.** El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el virus o vector viral es un virus o vector viral con envoltura.

**25.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el virus o vector viral es un virus o vector viral con envoltura.

**26.** El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en donde el virus o vector viral es un virus o vector viral con envoltura.

**A****B****Figura 1**

**A****B****Figura 2**

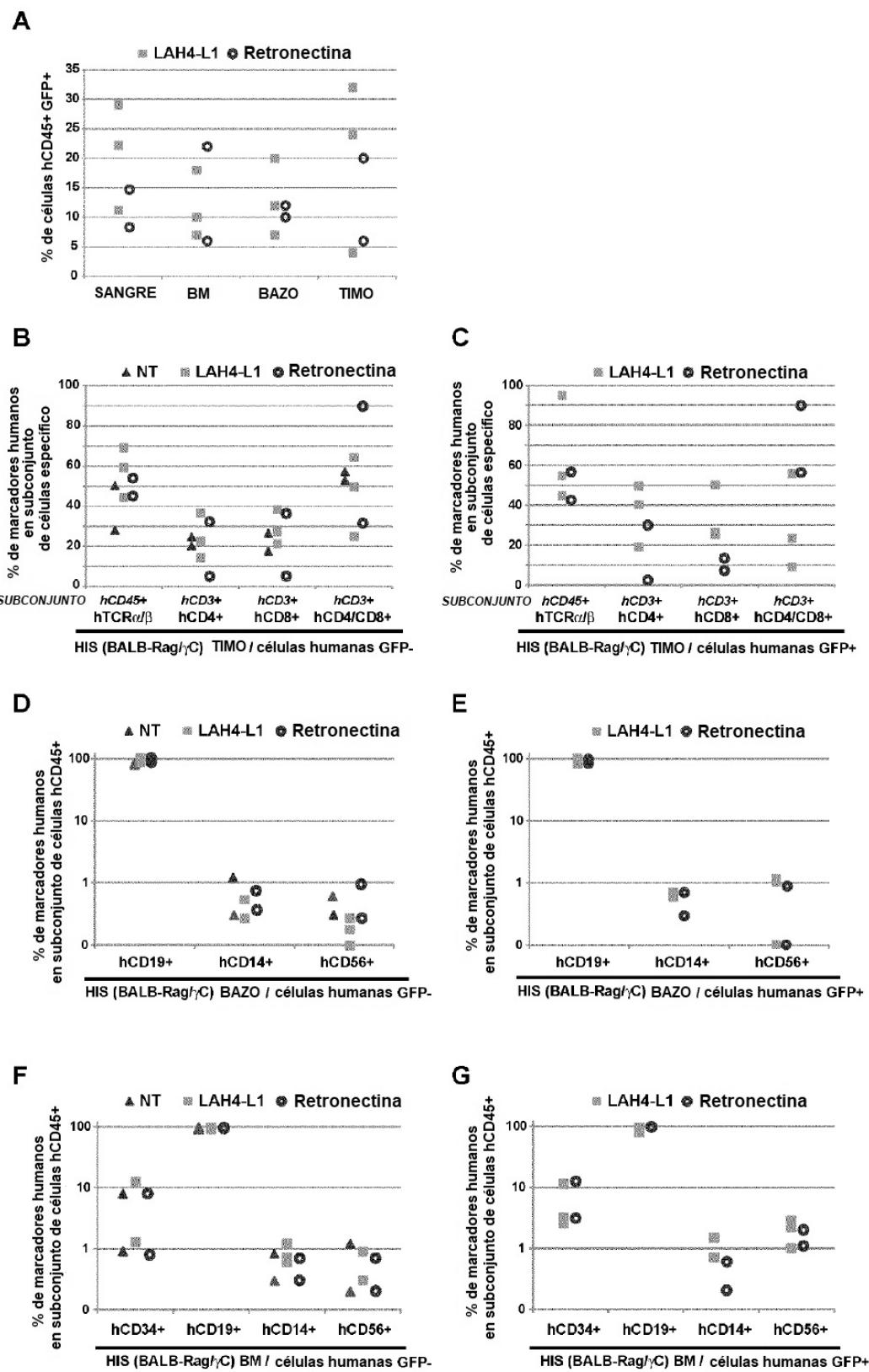


Figura 3

**A**

|             | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| LAH4-L1     | K | K | A | L | A | H | A | L | H | L  | L  | A  | L  | L  | A  | L  | H  | L  | A  | H  | A  | L  | K  | K  |    |    |
| LAK4-L1     | K | K | A | L | A | K | A | K | L | L  | A  | L  | L  | A  | L  | K  | L  | A  | K  | A  | K  |    |    |    |    |    |
| LAH8-L1     | H | H | A | L | A | H | A | L | H | L  | L  | A  | L  | L  | A  | L  | H  | L  | A  | H  | A  | L  | H  | A  |    |    |
| LAH4-L1-dK  |   |   | A | L | L | A | H | A | L | H  | L  | L  | A  | L  | L  | A  | L  | H  | A  | H  | A  | L  |    | A  |    |    |
| LAH4-L1-dKN |   |   | A | L | L | A | H | A | L | H  | L  | L  | A  | L  | L  | A  | L  | H  | L  | A  | H  | A  | L  | K  | K  |    |
| LAH4-L1-dKC | K | K | A | L | L | A | H | A | L | H  | L  | L  | A  | L  | L  | A  | L  | H  | L  | A  | H  | A  | L  |    | A  |    |
| LAH4-L1-R   | R | R | A | R | A | L | H | L | L | A  | L  | L  | A  | L  | L  | A  | L  | H  | L  | A  | H  | A  | R  | R  |    |    |
| LAH4        | K | K | A | L | L | A | L | H | H | L  | A  | H  | L  | A  | L  | H  | L  | A  | L  | A  | L  | K  | K  |    |    |    |

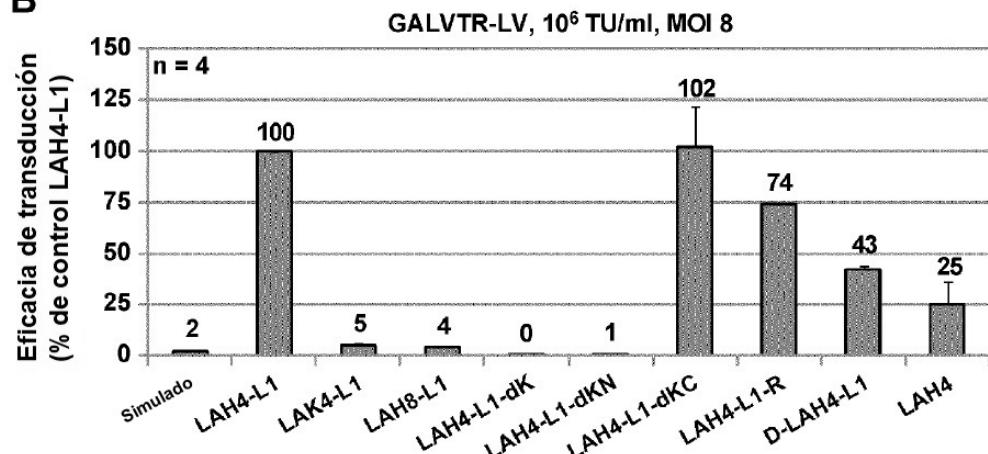
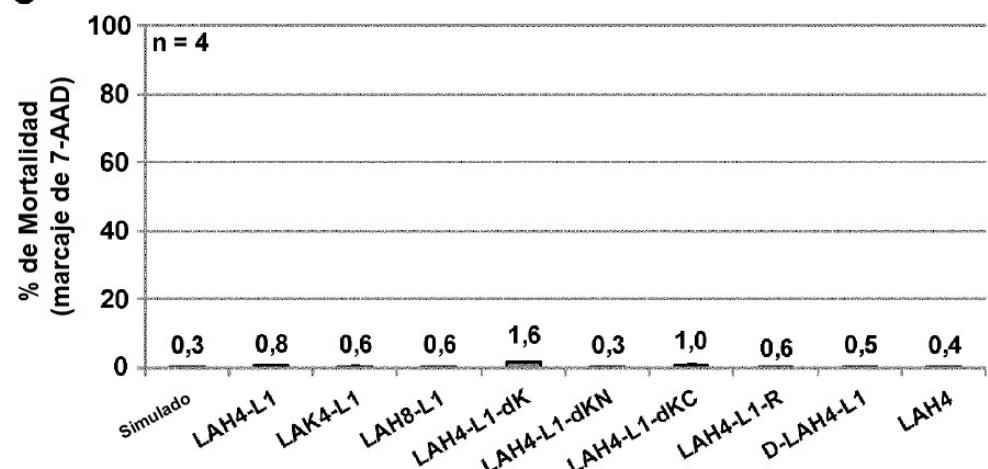
**B****C**

Figura 4

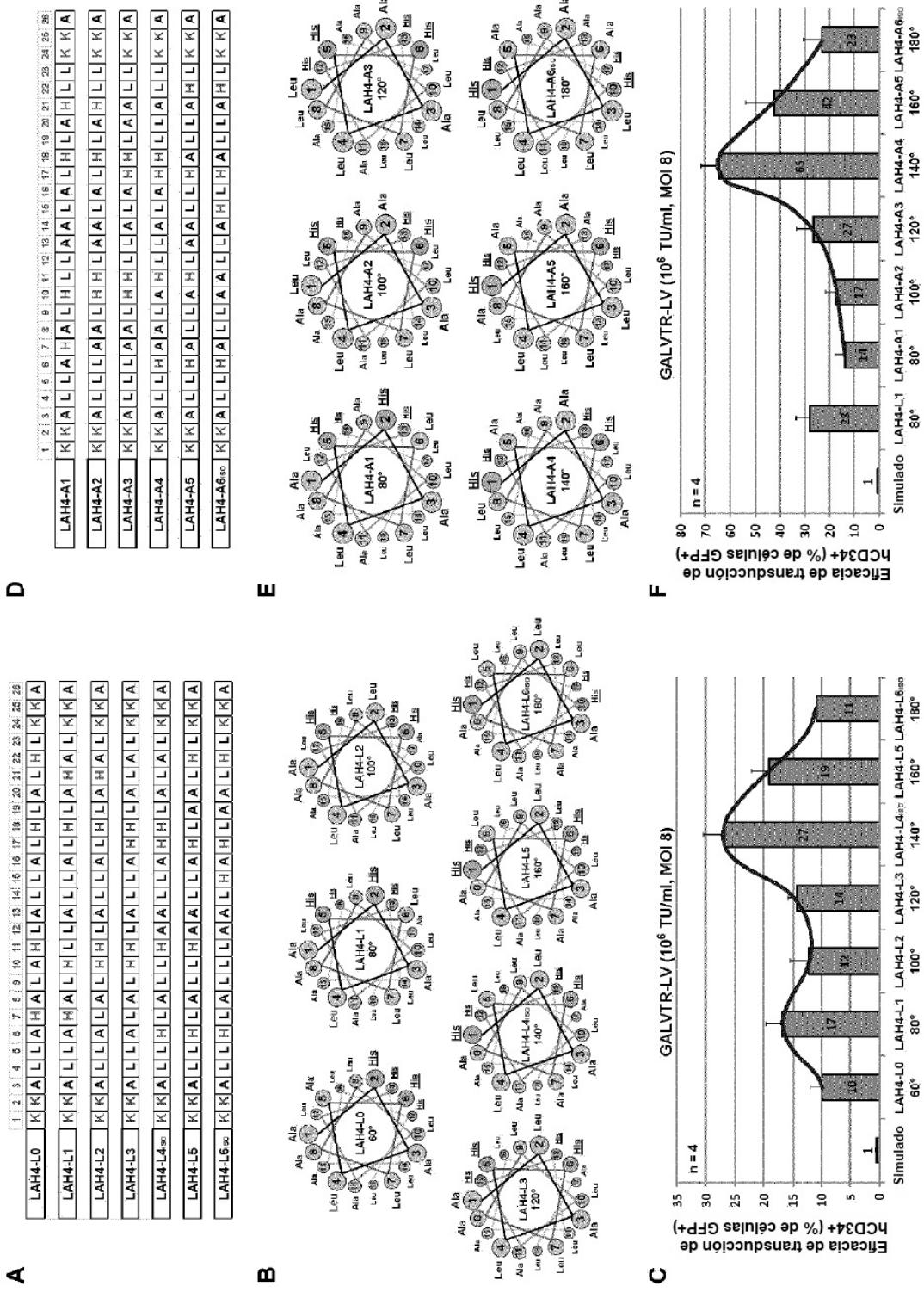
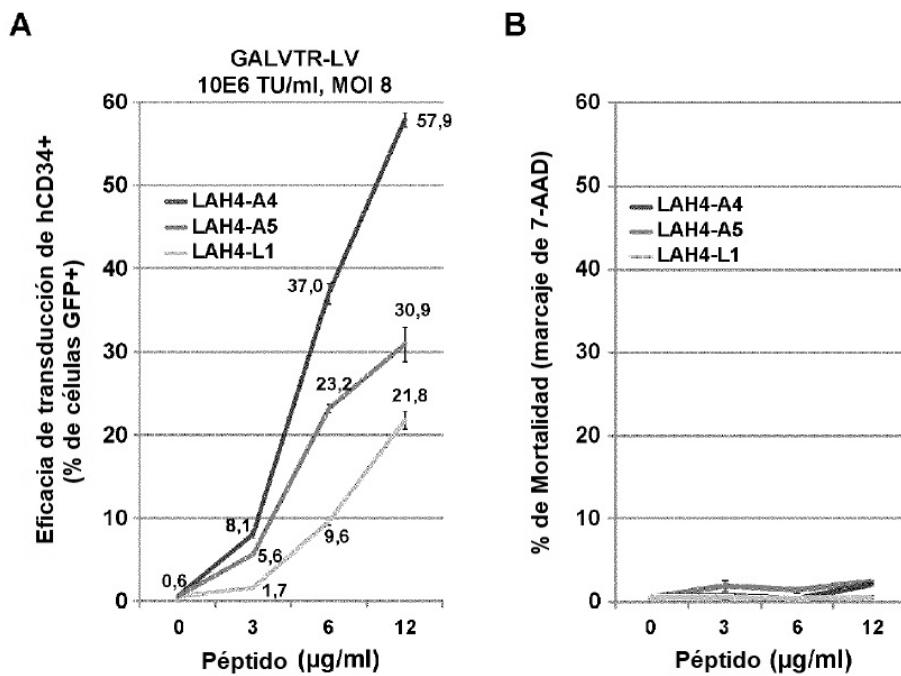


Figura 5

**Figura 6**

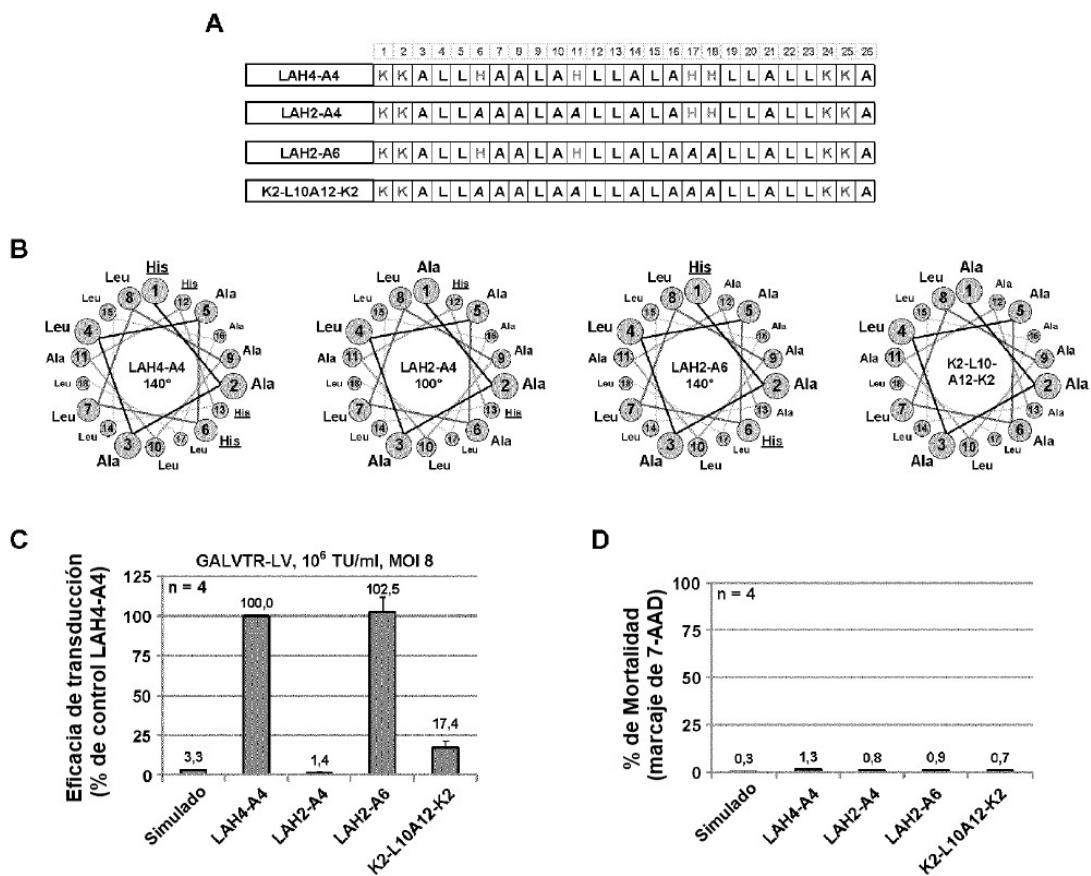
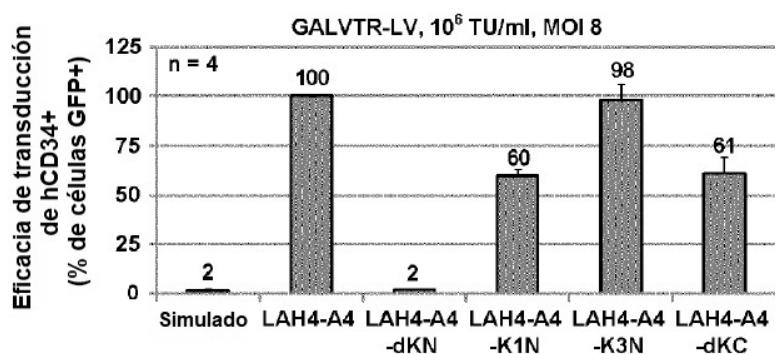
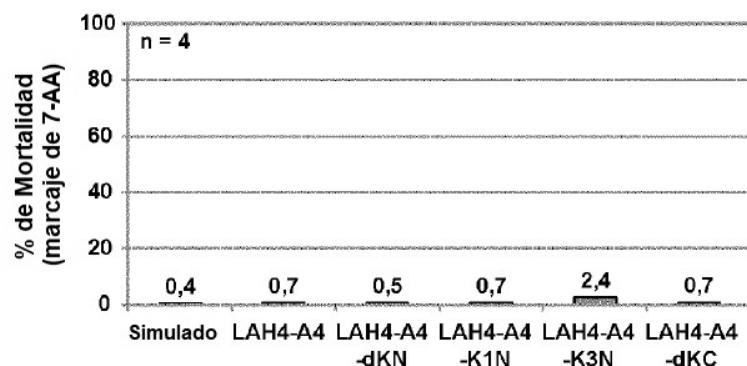


Figura 7

**A****B****C****Figura 8**

**A**

|               | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| LAH4-A4       | K | K | A | L | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | A  | L  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | K  |    |    |
| LAH4-A4-d1aa  | K | K | A | L | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | A  | L  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | K  |    |    |
| LAH4-A4-d2aa  | K | K |   | L | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | A  | L  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | K  |    |    |
| LAH4-A4-d2Caa | K | K | A | L | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | A  | L  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | K  |    |    |
| LAH4-A4-d3aa  | K | K |   |   | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | A  | L  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | K  |    |    |
| LAH4-A4-d5aa  | K | K |   |   | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | A  | L  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | K  |    |    |
| LAH4-A4-Leu   | K | K | L | L | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | A  | L  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | K  |    |    |
| LAH4-A4-P14   | K | K | A | L | L | H | A | A | L | A  | H  | L  | L  | P  | L  | A  | H  | H  | L  | L  | A  | L  | L  | K  | A  |    |

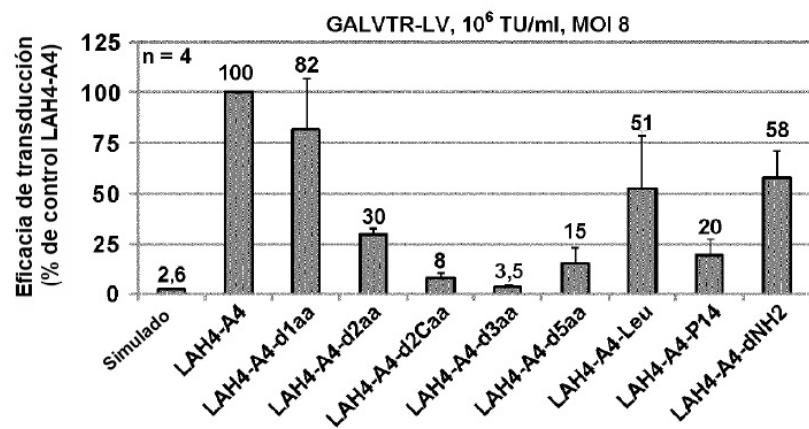
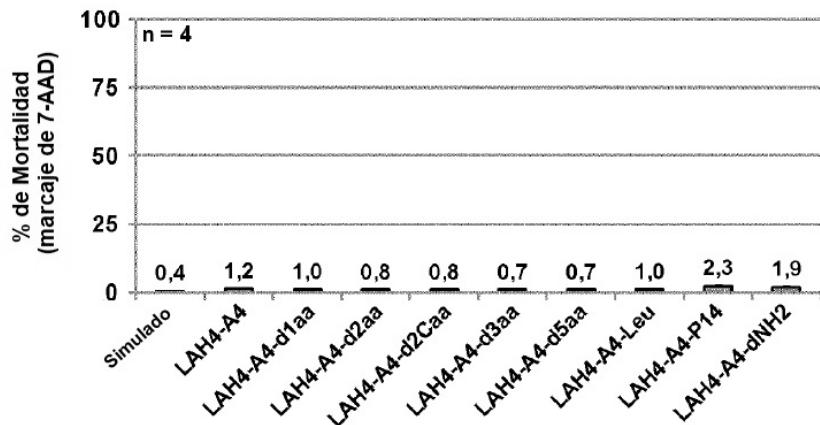
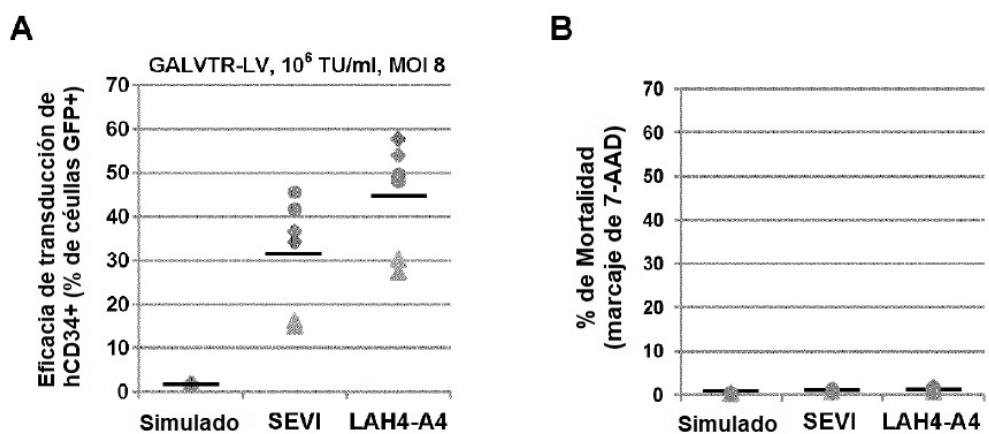
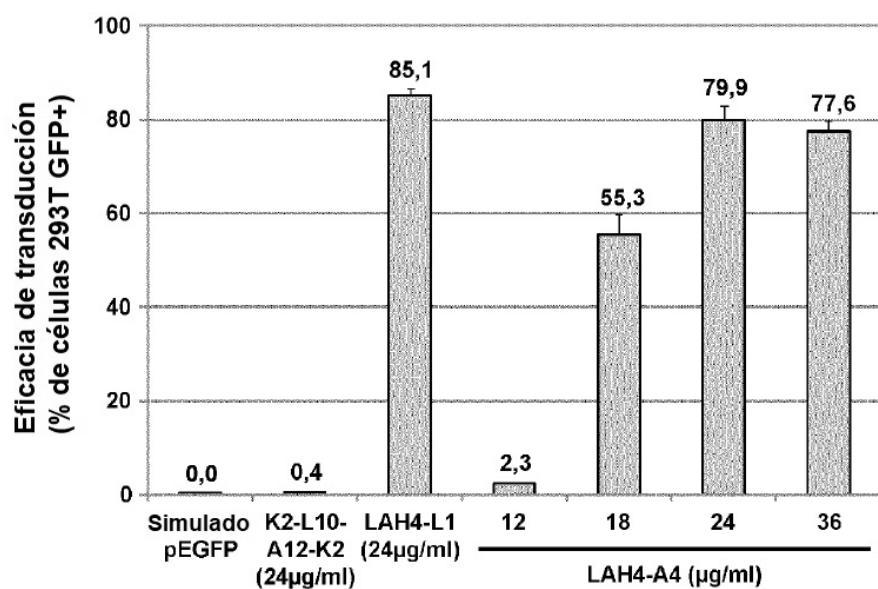
**B****C**

Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11**

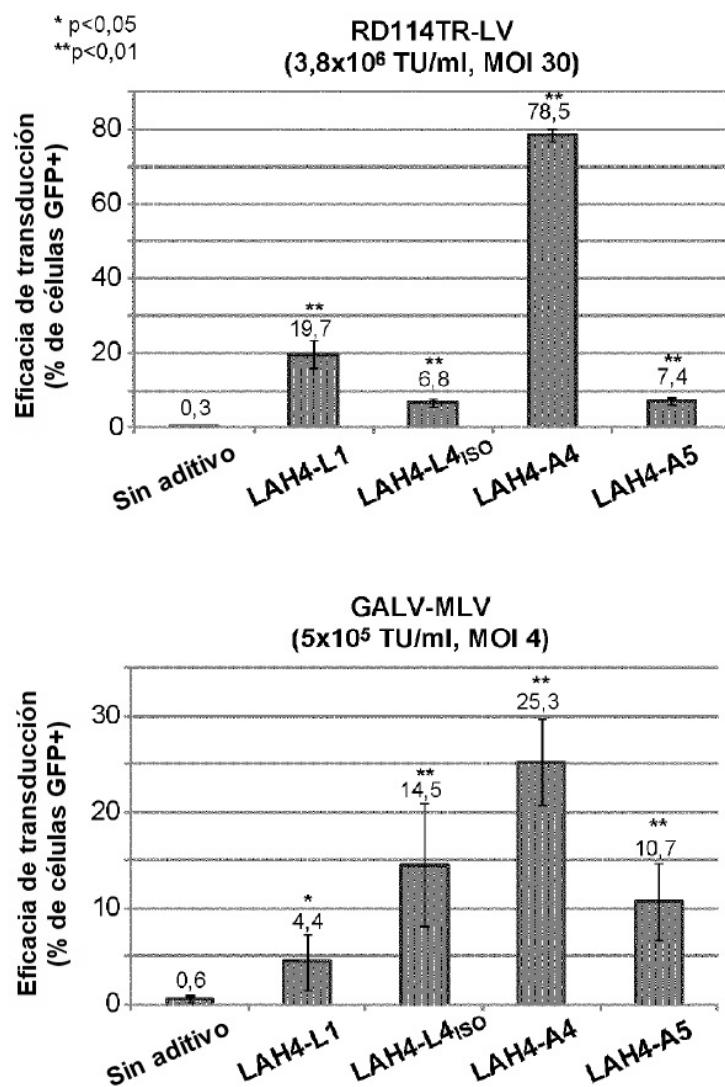


Figura 12