

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 424**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**C12N 15/867** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014 PCT/EP2014/058870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014 E 14724030 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2992004**

54 Título: **Protransducina B, un potenciador de la transferencia génica**

30 Prioridad:

**02.05.2013 EP 13166266**

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

**13.09.2018**

73 Titular/es:

**PHARIS BIOTEC GMBH (100.0%)  
Feodor-Lynen-Strasse 31  
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

**FORSSMANN, WOLF-GEORG;  
ZGRAJA, ANDREAS y  
RICHTER, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 681 424 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

Protransducina B, un potenciador de la transferencia génica

5 La presente solicitud se refiere a un péptido, a un medicamento que contiene dicho péptido, a dicho péptido para su uso en una terapia génica, a un procedimiento para potenciar la infección de una célula mediante una construcción vírica diseñada por ingeniería genética y al uso de dicho péptido para potenciar la infección de una célula por un virus.

10 La importancia del diseño por ingeniería genética ha aumentado en los últimos años debido a un progreso enorme en los procedimientos aplicados, porque se puede predecir que no solo la producción de principios activos de proteínas/péptidos, sino también la transfección de células con genes estables como herramienta de laboratorio y finalmente la introducción de genes en células como un remedio para los defectos genéticos serán muy relevantes para la terapia de numerosas enfermedades.

15 La introducción de material genético para cambiar las funciones celulares específicas se ha convertido en una herramienta indispensable de la investigación médica y biológica aplicada y básica debido a que la clonación de los primeros genes humanos y producción recombinante, y debido a que los procedimientos de transferencia génica experimentan un progreso continuo con eficacia creciente. Numerosos procedimientos de introducción de genes han conducido a la optimización. Las experiencias correspondientes han sido recogidas durante muchos años de historia, siendo muy lento al principio.

20 Incluso antes de la elucidación de la función del ácido desoxirribonucleico (ADN) en 1953 por F. Crick y J. Watson, F. Griffith hacia finales de la década de 1920 logró transformar en los experimentos cepas de *Pneumococcus* no patógenas en patógenas. Esta transformación se debió a una circunstancia afortunada, porque los neumococos tienen una competencia natural rara de captación de ADN. J. Lederberg, M. Delbrück y S. Luria, entre otros, consiguieron una introducción específica de ADN en procariotas, por medio de fagos, la denominada transducción. Con el establecimiento de cultivo celular, el cultivo de células eucariotas en condiciones *in vitro*, se ha desarrollado una cantidad de procedimientos físicos y químicos para la transfección. Los procedimientos físicos, que se utilizan con más frecuencia, pero requieren un equipo más costoso, incluyen la electroporación y la microinyección, que compitieron con los procedimientos químicos de aplicación más simple, tales como el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio normal en la década de 1980 y todavía hoy en día, o los procedimientos extendidos a principios de la década de 1990, que se basan en lípidos catiónicos o polímeros catiónicos. Sin embargo, el uso de estos procedimientos siempre ha sido dependiente de las células o del ADN. Asimismo, el ADN introducido en las células fue generalmente extracromosómico (transfección transitoria), y por lo tanto no pasó a las células hijas. Sin embargo, los fagos (por ejemplo, fago lambda) eran conocidos por ser capaces de integrar su ADN en el genoma hospedador (profago, vía de infección lisogénica). A partir de ello, había solo un paso pequeño (1981/1982) para el "Establecimiento de retrovirus como vectores genéticos" (por Doehmer y col. y Tabin y col.). Los virus son específicos de las especies y específicos de los órganos/tejidos, es por ello que todos los virus no infectan todas las células (eucariotas). Las alteraciones en la envoltura vírica (intercambio de glucoproteínas, que se denominan virus pseudotipados) y las adiciones de péptidos principalmente catiónicos se considera que potencian la eficacia de la transducción.

40 Los primeros potenciadores de la captación de partículas víricas captaron la atención en el estudio del VIH. Durante los análisis de la infección *in vitro* mediante una prueba celular específica, se observó la inhibición de la fusión del VIH mediante péptidos de filtración de sangre (Münch y col., VIRIP).

Se demostró que estos fragmentos de proteínas, que se originan sorprendentemente de manera natural, forman estructuras fibrosas como potenciadores en esperma humano, "Potenciador de la infección vírica derivado de semen" (SEVI), que se caracterizan como fibrillas amiloides. Estas nanofibrillas potencian el acoplamiento de virus a sus células diana, aumentando la tasa de infección vírica por varias potencias de diez.

45 Esto se utilizó para mejorar la transferencia génica retrovírica para la investigación básica y para posibles aplicaciones terapéuticas futuras. Por lo tanto, se pudo demostrar que los vectores retrovíricos gamma y lentivíricos, que se usan para la terapia génica, exhiben una tasa de transferencia génica muy superior en presencia de la proteína SEVI para tipos de células diferentes, tales como linfocitos T humanos, células de carcinoma del cuello uterino, células leucémicas, células madre hematopoyéticas y células madre embrionarias (Wurm y col., J. Gene Med. 2010, 12, 137-46; Wurm y col., Biol. Chem. 2011, 392, 887-95).

55 Los estudios para el desarrollo de potenciadores adicionales, tales como SEVI y seminogelina, condujeron a la suposición de que los péptidos de proteínas de envoltura víricas también pueden ser adecuados como potenciadores de la transfección, lo cual tuvo sorprendentemente un gran éxito inesperado (Maral Yolamanova, Nature Nanotechnology, Vol. 8, n.º 2, págs. 130-136). Por lo tanto, se pudo demostrar, por ejemplo, que los VIH preincubados con distintas concentraciones (1-100 µg/ml) de protransducina A (sinónimo: EF-C) exhiben una tasa de infección con células indicadoras que está aumentada por varias potencias de diez. Como mecanismo de acción, se asumió que EF-C forma estructuras fibrilares que son capaces de unir y concentrar virus y, en consecuencia, aumentar la entrada de virus en la célula. Además de la infección con partículas víricas, EF-C potencia la

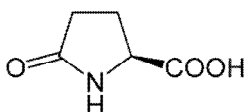
transducción de partículas lentivíricas y retrovíricas con eficacia elevada en una amplia variedad de tipos de células humanas (linfocitos T, células gliales, fibroblastos, células madre hematopoyéticas) aplicadas en terapia génica (Jan Münch y col., Nature Nanotechnology, Vol. 8, n.º 2, págs. 130-136). El documento EP 2 452 947 A1 también se refiere a la protransducina A.

- 5 Debido a la importancia creciente de la tecnología génica según se ha establecido anteriormente, se desean potenciadores más eficaces de la transferencia génica. El objeto de la invención es proveer un potenciador mejorado de la transferencia génica.

Sorprendentemente, se ha descubierto que un péptido que tiene la secuencia



- 10 en la que el grupo X-Glu representa el aminoácido ácido piroglutámico



logra el objeto de la invención.

- 15 Sorprendentemente, se ha descubierto que la modificación del extremo N-terminal por ácido piroglutámico *in vitro* (sin influencias celulares, especialmente la presencia de enzimas) da como resultado un aumento enorme en la estabilidad de la protransducina en solución acuosa. Esto resulta evidente a partir de los resultados mostrados en la Figura 1.

- 20 En la columna izquierda de la Figura 1 (cromatograma por HPLC), los resultados para la protransducina A después del almacenamiento durante 0-13 días a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (13 días) se comparan con los resultados para protransducina B en las mismas condiciones. Está claro que la protransducina A se degrada hasta prácticamente la mitad después del almacenamiento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 13 días, mientras que la protransducina B se degrada difícilmente del todo en las mismas condiciones de almacenamiento (la altura de los valores máximos corresponde a la concentración de los componentes contenidos en la muestra).

- 25 En Journal of Biological Chemistry, Vol. 286, n.º 45, págs. 38825-38832, S. Jawhar y col. informan sobre el estado de la ciencia con respecto a los péptidos amiloides, especialmente los polipéptidos amiloides modificados por piroglutamato. Dichos polipéptidos amiloides tienen una gran cantidad de aminoácidos y no se pueden comparar básicamente con los péptidos de cadena corta, a los cuales pertenecen también aquellos de acuerdo con la invención. En relación con esto, esta mini revisión se refiere a los eventos celulares que se originan en condiciones *in vivo* en presencia de enzimas, que no es de ninguna manera comparable, sin embargo, a las condiciones en las que se ha mejorado la estabilidad de la protransducina de acuerdo con la invención, es decir, condiciones *in vitro*.

- 30 El péptido de acuerdo con la invención se puede usar también como medicamento.

La invención se refiere también al uso del péptido de acuerdo con la invención en terapia génica para tratar enfermedades que se pueden tratar con terapia génica.

La invención se refiere también a un procedimiento para potenciar la infección de una célula por un virus, que comprende las etapas de:

- 35
- proveer el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 disuelto en un disolvente orgánico;
  - añadir el péptido a una solución acuosa para formar agregados insolubles del péptido;
  - mezclar la solución de la última etapa precedente; y
  - cultivar las células.

- 40 La presente invención se refiere también al uso del péptido de acuerdo con la invención para potenciar la infección de una célula con un virus. Finalmente, también se reivindica un kit que contiene el péptido de acuerdo con la invención.

Se puede preparar el péptido de acuerdo con la invención (protransducina B), por ejemplo, mediante el procedimiento de acuerdo con Merrifield con aminoácidos protegidos por Fmoc.

- 45 Este procedimiento funciona con derivados protegidos por Fmoc, es decir, con aminoácidos protegidos por 9-fluorenilmetoxicarbonilo, en una síntesis de fase sólida gradual de acuerdo con el principio de Merrifield, especialmente sobre una resina de Wang precargada con Fmoc-L-glutamina (0,59 mmol/g, 100-200 mesh) como un soporte sólido sobre el sintetizador ABI-433.

La activación de los Fmoc-L-aminoácidos, que se emplearon normalmente en un exceso molar de diez veces, se llevó a cabo con [(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) (HBTU, 100 mmol/l) con

## ES 2 681 424 T3

adiciones de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) 0,5 M y diisopropiletilamina (DIEA) 2 M en N-metil-2-pirrolidinona (NMP) a temperatura ambiente.

Las reacciones de acilación individuales duran 45 minutos, y la desprotección por Fmoc con piperidina al 20 % dura 15 minutos.

- 5 Los siguientes derivados de aminoácidos y grupos protectores de cadena lateral escindibles con ácido ortogonales relacionados se emplean para la síntesis:

Fmoc-L-Asn(Trt), Fmoc-L-Cys(Trt), L-pGlu, Fmoc-L-Gln(Trt), Fmoc-L-Ile, Fmoc-L-Lys(Boc), Fmoc-L-Met y Fmoc-L-Trp(Boc).

- 10 Después de escindir el soporte de resina de la resina de peptidilo con 94 % de ácido trifluoroacético (TFA), 3 % de etanoditiol (EDT) y 3 % de agua desmineralizada, se precipita el péptido en bruto en terc-butil metil éter frío, el péptido en bruto se elimina por centrifugado como un sedimento y se descarta el sobrenadante.

La purificación cromatográfica posterior del péptido en bruto se efectúa en un modo preparatorio mediante elución en gradiente.

- 15 La diferencia entre la protransducina A de acuerdo con el documento EP 2 452 947 A1 y la protransducina B reside en el hecho de que el ácido L-piroglutámico (pGlu) sintético se inserta N-terminalmente a cambio de L-glutamina (Gln) sintética en protransducina B. La glutamina original se modifica mediante el cierre del anillo para formar una lactama.

Purificación:

- 20 Separación preparatoria: La purificación se lleva a cabo sobre una HPLC de la compañía Gilson. El detector UV/VIS es de la compañía Kronwald, y la separación se detecta a la longitud de onda de 230 nm. El caudal es 40 ml/min.

La columna es un cartucho Waters Prep-Pak C18 (47 x 300 mm).

Eluyente A: TFA al 0,1 % en agua desmineralizada; eluyente B: TFA al 0,1 % en el 80 % de acetonitrilo y el 20 % de agua desmineralizada.

El gradiente para protransducina B es 35 %-55 % de eluyente B en 40 min, es decir, eluyente B al 0,5 % por minuto.

- 25 La protransducina B se eluye al 40 % de eluyente B y se recoge en varias fracciones de 0,5 hasta 1 min. Las fracciones analíticamente limpias se agruparon y se liofilizaron.

Procedimiento para la aplicación:

Liofilización:

- 30 La unidad Epsilon 1/45 de la compañía Christ, cuyos datos técnicos se ajustan de la siguiente manera, se usa para la criodesecación: área de los estantes 3,78 m<sup>2</sup>; capacidad de hielo aproximadamente 60 kg; rendimiento de condensador de hielo máx. 45 kg/24 h; presión parcial final de bomba de vacío  $1 \times 10^{-3}/10^{-4}$  mbar con/sin lastre de gas; datos de criodesecación (unidad accionada manualmente con lastre de gas): presión parcial final  $1 \times 10^{-2}$  mbar; temperatura de condensador de hielo -50 °C; temperatura de los estantes +15 °C; punto de operación de calefacción de los estantes 0,5 mbar; tiempo de criodesecación hasta 3 días.

- 35 Transducción de células con protransducina B

Se disuelven 0,5 mg de protransducina B en 50 µl de DMSO. Después se añaden 450 µl de PBS a la solución, y se forman fibrillas en 3 min. Se añade esta solución madre (1 mg/ml) a los vectores para obtener una concentración de protransducina B de 25 µg/ml. Se agita con Vortex la solución durante 1 min, después se centrifuga con 5000 g durante 5 min. Se descarta el sobrenadante, y el sedimento se suspende en un poco de PBS y se añade a las células. Las células se incuban en un incubador durante 2 días.

- 40 La tasa de transducción se potencia significativamente mediante la protransducina B. Hasta que se pudo transducir el 96 % de las células mediante protransducina B.

### LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Pharos Biotec GmbH

<120> Protransducina B, un potenciador de la transferencia génica

<130> 140997wo

ES 2 681 424 T3

<150> EP13166266.0

<151> 02-05-2013

5 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

10 <211> 12

<212> PRT

<213> péptido artificial

<220>

15 <223> bloqueado en N-terminal

<400> 1

20 Glu Cys Lys Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que tiene la secuencia

X-Glu-Cys-Lys-Ile-Lys-Gln-Ile-Ile-Asn-Met-Trp-Gln,

en la que el grupo X-Glu es el aminoácido ácido piroglutámico.

5 2. Un medicamento que contiene un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en terapia génica para tratar enfermedades que son tratables con terapia génica.

4. Un procedimiento para potenciar la infección de una célula por un virus, que comprende las etapas de:

- 10
- proporcionar el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 disuelto en un disolvente orgánico;
  - añadir el péptido a una solución acuosa para formar agregados insolubles del péptido;
  - mezclar la solución de la etapa precedente; y
  - cultivar las células.

5. Uso *in vitro* del péptido de acuerdo con la reivindicación 1, para potenciar la infección de una célula con un virus.

6. Un kit que contiene un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

15

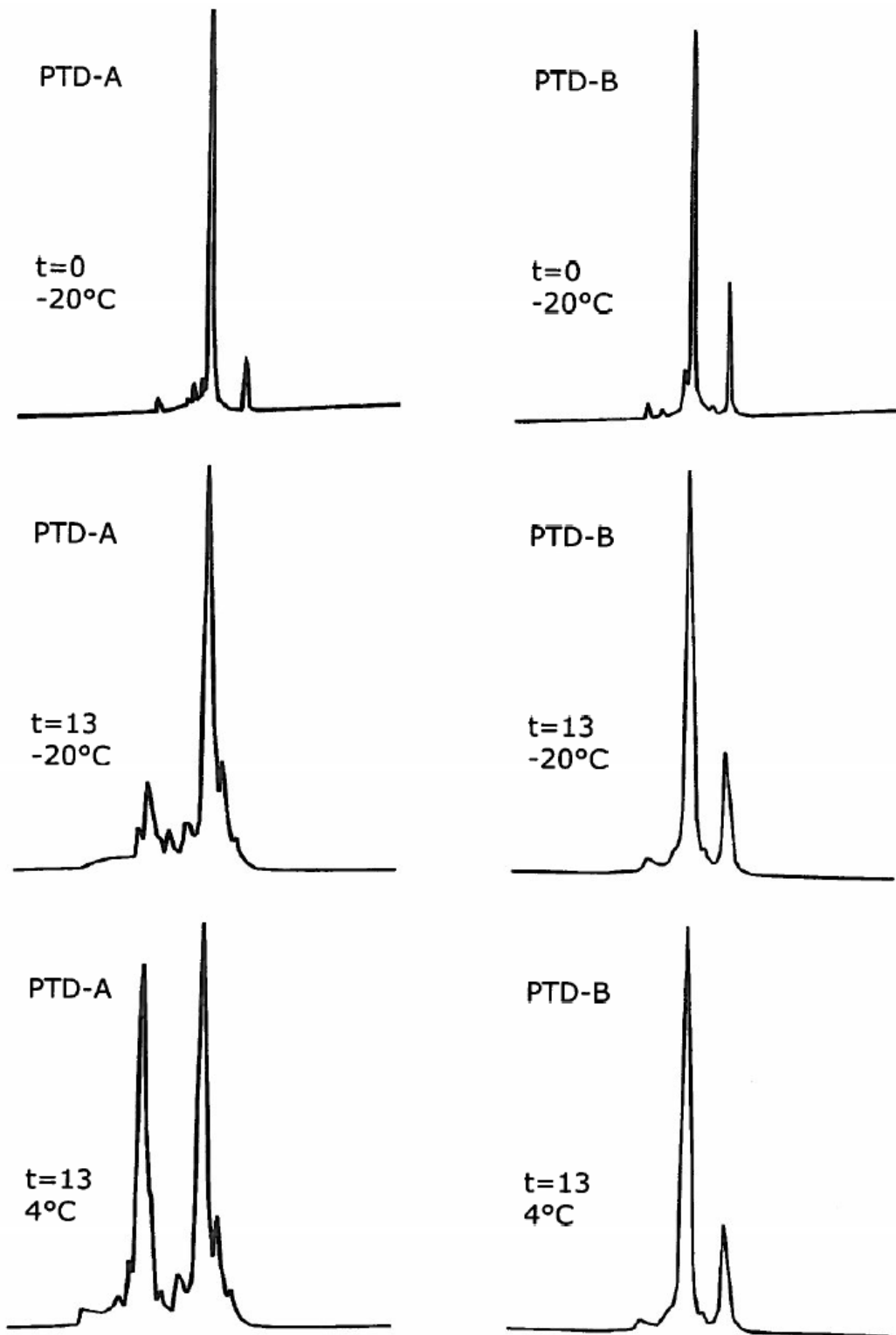


Fig. 1