

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 148 063**

21 Número de solicitud: **009800476**

51 Int. Cl. 7: **C07K 14/075**

C07K 14/09

A61K 48/00

A61P 43/00

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **06.03.1998**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2000**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.10.2000

71 Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA
DE BARCELONA**

08193 Bellaterra, Barcelona, ES

72 Inventor/es: **Villaverde, Antonio;**
Feliu, Jordi X.;
Aris, Anna;
Knight, Andrew;
Harbottle, Richard P.;
Benito, Antoni y
Coutelle, Charles

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

54 Título: **Proteína híbrida para utilizar en la liberación dirigida de un compuesto a una célula humana o animal.**

57 Resumen:

Proteína híbrida para utilizar en la liberación dirigida de un compuesto a una célula humana o animal. La invención se refiere a una proteína híbrida para utilizar en la liberación dirigida de un compuesto a una célula humana o animal que comprende a) un péptido vírico de unión celular dirigida o una variante modificada de dicho péptido vírico de unión celular dirigida capaz de unirse a una célula; y b) un compuesto; de manera que al poner en contacto dicha proteína híbrida con una célula humana o animal, dicha proteína híbrida se internaliza en la célula y es activa dentro de ella. Es especialmente ventajosa para la terapia génica y enzimática de humanos y animales.

ES 2 148 063 A1

proteína híbrida en un cultivo celular que comprende dicha célula.

Con respecto a esto, una realización preferida es cuando una célula de dicho cultivo celular (mencionado anteriormente) se introduce, a continuación, en un cuerpo humano o animal.

En aún otra realización de la invención, el compuesto es un proteína activa.

Con respecto a esto, una realización preferida de la invención se refiere a una proteína híbrida de la invención, en donde dicha proteína híbrida que comprende el péptido vírico de unión celular dirigida y el compuesto se obtiene como un único polipéptido recombinante.

Dicha proteína híbrida se ilustra en un ejemplo de la presente invención (véase más abajo).

En otra realización preferida de la invención, el compuesto es una molécula de ADN. Preferiblemente, dicha molécula de ADN es una molécula de ADN que es capaz de replicarse dentro de la célula, en donde es introducida de acuerdo con la invención. Dicha molécula de ADN puede ser una molécula de ADN capaz de integrarse en el cromosoma de la célula, un plásmido capaz de replicarse dentro de la célula, un plásmido que permita una expresión génica transitoria o oligonucleótidos antisentido.

Materiales y métodos

Plásmidos y cepas bacterianas. Los plásmidos pAB1 y pM275VP1 dirigen la síntesis, controlada por el represor CI857, de proteínas quiméricas β -galactosidasa que transportan péptidos del virus de la fiebre aftosa (VFA) en el extremo amino y en la interfaz activadora (residuos del 272 al 287) (Jacobson et al., Nature 369:761-766(1994)) respectivamente. Estos péptidos reproducen un segmento de la proteína VP1 del aislado C-Sta. Pau, Spain/70, clon C-S8c1 (Sobrinho et al., Virology 128:310-318 (1983)) del VFA, que contiene el motivo RGD y las secuencias flanqueantes. Más detalles acerca de dichas proteínas se pueden encontrar en Benito y Villaverde, FEMS Microbiol. Lett. 123:107-112 (1994), y Benito et al., Bio/Technology 13:801-804(1995). El plásmido AB1275VP1 codifica un híbrido entre esas dos proteínas y transporta 2 péptidos víricos en cada monómero, en el extremo N-terminal y en la interfaz activadora del enzima, respectivamente. Su construcción se realizó reemplazando el fragmento *NcoI-AocI* de pM275VP1 por su equivalente de pAB1. La construcción de pAB1275VP1 se describe en detalle en Benito et al., Biol. Chem. 271:21251-21256 (1996). Todas estas proteínas son enzimáticamente activas. La producción de la proteína AB1 se realizó en la cepa M72 (Vidal et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:788-792 (1991)), mientras que M275VP1 y AB1275VP1 se han obtenido en la cepa BL26 Lon⁻ (Studier and Moffat, J.Mol.Biol. 189:113-130 (1986)). El plásmido pJLACZ (Benito et al., J. Biotechnol. 29:299-306 (1993)) en la cepa BL26 se usó para obtener una proteína β -galactosidasa no fusionada para ser usada como control (la proteína LACZ).

Producción y purificación de proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes se produjeron en un biorreactor Biostat B (B. Braun, Germany), con un volumen de trabajo de 2 litros. El inóculo provenía de un cultivo de noche de 25 ml,

crecido a 28°C en medio LB con 100 mg/ml de ampicilina. La síntesis de las proteínas de fusión se indujo por un incremento de temperatura de 28 a 42°C a una OD₅₅₀ de alrededor 0.4. El flujo de aire se mantuvo constante a 6 litros min⁻¹, el pH a 7.2 con 0,5 M de HCl y 4 M de NaOH, y la pO₂ se fijó al 50% de su valor de saturación mediante el control de la agitación. Algunos experimentos de producción se realizaron también en matraces de 1 l. Después de 6 horas de inducción, las células se recogieron por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 15 ml del tampón de purificación (Ullmann, Gene 29:27-31 (1984)), con 25 μ M benzamidina y 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro como inhibidores de proteasas, y sonificado tal y como se ha descrito previamente (Feliu and Villaverde, Biotech. Tech. 8:509-514 (1994)) en un disruptor celular Braun Labsonic U. Después de centrifugar, el sobrenadante se pasó 3 veces por una columna de TPEG-Sepharose de 20 ml equilibrada con el tampón de purificación (0.02 M Tris, 0,01 M MgCl₂, 1,6 M NaCl, pH 7,5) y la proteína retenida se eluyó, después de lavados, con 0,1 M de borato sódico con 0,01 M 8-mercaptoethanol a pH 10, de acuerdo a protocolos descritos (Ullmann, Gene 29:27-31 (1984)). Las muestras se dializaron contra tampón TM (0,02 M Tris, 0,01 M MgCl₂, pH 7,5). Las proteínas purificadas se analizaron por PAGE seguida por inmunotransferencia (Benito et al., Bio/Technology 13:801-804 (1995)) y tinción con azul de Coomassie, se cuantificaron por ELISA indirecto con suero anti- β -galactosidasa y fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

Ensayo de unión celular. Se modificaron procedimientos ya descritos (Hart et al., J. Biol. Chem. 269:12468-12474 (1994), Brasaemle and Attie, BioTechniques 6:418-419 (1988)) para analizar la unión celular a proteínas de fusión β -galactosidasa. En general, 2,5 pmols de proteína disuelta en PBS se unieron a placas ELISA COSTAR EIA/RIA durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron en PBS y se bloquearon con 3% BSA en PBS durante 1 hora a 37°C. De cultivos celulares a un 80% de confluencia, se obtuvieron células en suspensión por tripsinización y se añadieron a los pocillos a 7x10⁵ células/ml (50 μ l por pocillo), se incubaron a 37°C durante 90 minutos, se lavaron suavemente en PBS y las células retenidas se fijaron con metanol. Después de una tinción con cristal violeta y un lavado con PBS, las células se lisaron con 1% SDS y se midió la absorbancia 570 nm (A₅₇₀) en un lector de placas de ELISA. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las medidas de unión residual (el valor de fondo) se obtuvieron a través de la unión de las células a BSA. Se usaron las siguientes líneas celulares: HeLa (carcinoma de cervix humano, ECACC 85060701), COS7 (células de riñón de mono transformadas con SV40, ECACC 87021302), CaCo-2 (adenocarcinoma de colon humano, ECACC 86010202), 3T3 (fibroblasto de embrión de ratón, ECACC 88031146), Saos2 (sarcoma osteogénico humano, ATCC HTB 85) y C33A (carcinoma de cervix humano, ATCC HTB 31), todas ellas obtenidas de colecciones ordinarias.

unión celular dirigida y b) un compuesto, significa en la invención una proteína híbrida en donde dicho péptido vírico de unión celular dirigida y dicho compuesto están unidos por enlaces covalentes.

Dicho péptido vírico de unión celular dirigida y dicho compuesto pueden estar unidos por enlaces covalentes, por ejemplo, realizando un proceso de enlace químico o, por ejemplo, obteniendo una molécula recombinante que comprende ambos elementos.

El término "*un péptido vírico dirigido*" significa un péptido vírico de unión celular dirigida capaz de unirse a células como, por ejemplo, el péptido vírico dirigido de la proteína VP1 descrito por Villaverde et al. (Gene 108:101-106 (1996)).

El término "*una variante modificada de un péptido vírico de unión celular dirigida*" significa una variante del péptido vírico de unión celular dirigida presente en la naturaleza, todavía capaz de unirse a una célula.

Dicha variante se obtiene generalmente a partir de los conocimientos de la estructura del péptido vírico de unión celular dirigida presente en la naturaleza y puede ser una variante que se une a un receptor distinto de una célula comparado con el del péptido vírico presente en la naturaleza.

Dichas variantes adecuadas están descritas por Wickham et al., (Gene Ther. 2:750-756 (1995)); y en J. Virol. 71:8221-8229 (1997)), las cuales son variantes de péptidos víricos dirigidos obtenidos por ingeniería recombinante.

Las variantes adecuadas también pueden obtenerse sintéticamente tal y como describe Bekkers et al. (Eur. J. Biochem. 238:70-76 (1996)).

El término "*poner en contacto*" en referencia a poner en contacto una proteína híbrida según la invención con una célula debe interpretarse en su sentido más amplio, es decir, que se ponen en contacto mutuamente. Se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la incubación de la proteína híbrida *in vitro* con una célula o, por ejemplo, mediante la administración de la proteína híbrida a un humano o animal, en donde el poner en contacto será *in vivo*.

El término "*una célula humana o animal*" significa cualquier célula humana o animal. Dicha célula puede estar comprendida en un cultivo celular *in vitro* o puede estar comprendida en un cuerpo humano o animal.

El término "*un compuesto*" significa cualquier compuesto que pueda ser de interés para liberar en una célula específica de interés. Dicho compuesto puede ser una molécula orgánica, una proteína activa o una molécula de ADN.

El término "*una composición farmacéutica que comprende una proteína híbrida*" según la invención, puede ser una composición farmacéutica que comprende una composición simple que incluye la proteína híbrida y otros elementos, o puede ser una composición farmacéutica que comprende dos o más composiciones en donde la proteína híbrida puede estar comprendida en todas ellas o puede estar en una de ellas.

A continuación, se describen realizaciones preferidas de la invención mediante ejemplos no limitativos de la misma.

Descripción detallada de la invención

En una realización según cualquiera de los aspectos de la invención,

el péptido vírico de unión celular dirigida puede obtenerse a partir de un picornavirus, en particular a partir del virus de la fiebre aftosa (VFA); o

el péptido vírico de unión celular dirigida puede obtenerse a partir de un adenovirus (Ad).

El término "*obtenible o que puede obtenerse*" significa que un péptido dirigido a células de un virus presente en la naturaleza capaz de unirse a una célula puede obtenerse a partir de dicho virus.

En un ejemplo de la presente invención, el cual se mostrará más adelante, se describe un péptido vírico de unión celular dirigida adecuado que puede obtenerse a partir del virus de la fiebre aftosa (VFA), y Wickham et al., en Gene Ther. 2:750-756 (1995) y en J. Virol. 71:8221-8229 (1997) describe un péptido vírico de unión celular dirigida que puede obtenerse a partir de un adenovirus.

Con respecto a lo descrito anteriormente, una realización de la invención se refiere a una variante de un péptido vírico de unión celular dirigida que puede obtenerse a partir de un picornavirus o a partir de un adenovirus.

Wickham et al., en las referencias mencionadas más arriba, ha descrito variantes adecuadas de adenovirus como, por ejemplo, una variante de un péptido vírico de unión celular dirigida modificado para que comprenda el motivo LDV en lugar del motivo RGD de tipo salvaje (presente en la naturaleza) (véase Gene Ther. 2:750-756 (1995)).

Otra realización, según cualquiera de los aspectos de la invención, se refiere al péptido vírico de unión celular dirigida en donde el péptido comprende el motivo de aminoácidos RDG.

El motivo RDG está comprendido en un péptido de 30 aminoácidos de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa (VFA) localizado en el bucle G-H, una protuberancia desordenada expuesta al disolvente del virus.

Este segmento expuesto contiene el ácido arginina-glicina-aspartico (RGD) tripéptido de adhesión a células, un conocido ligando de unión a integrina (Ruoslahti et al., (Science 238:491-497) (1987)).

En la figura 1 de la presente invención se describe un péptido de 23 aminoácidos de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa, y es una realización especialmente preferida para un péptido vírico de unión celular dirigida tal y como se ha descrito en la presente invención.

De acuerdo con esto, en otra realización según cualquiera de los cuatro aspectos de la invención, dicho péptido vírico de unión celular dirigida se une a una integrina en una célula, en particular a un receptor de vitronectina en una célula.

En otra realización preferida de la invención el contacto de dicha proteína híbrida con una célula se realiza mediante la introducción de dicha proteína híbrida en un cuerpo humano o animal que comprende dicha célula.

En otra realización preferida de la invención, el contacto de dicha proteína híbrida con una célula se realiza mediante la incubación de dicha

A continuación, se muestran algunos ejemplos a modo ilustrativo pero no limitativo de la invención.

Ejemplos

Los cuatro primeros ejemplos hacen referencia a una proteína híbrida según la presente invención que comprende una pequeña región de la proteína VP1 de VFA como péptido vírico de unión celular y la proteína β -galactosidasa como componente. Se describe la construcción de dicha proteína híbrida (ejemplo 1) y una evaluación de sus propiedades: la capacidad de unión a diferentes tipos celulares (ejemplo 2), la internalización dirigida por el péptido VP1 (ejemplo 3) y la actividad enzimática (estabilidad) de la proteína internalizada (ejemplo 4).

El quinto ejemplo se refiere a una proteína híbrida según la presente invención que comprende una pequeña región de la proteína VP1 de VFA como péptido vírico de unión celular y ADN foráneo (en particular el gen de la luciferina) como componente.

Ejemplo 1

Propiedades biológicas de proteínas β -galactosidasa conteniendo péptidos de unión a células del VFA.

En este estudio se han usado varias proteínas β -galactosidasa ingenierizadas genéticamente. Las proteínas AB1 y M275VP1 contienen 4 copias del motivo RGD del VFA, 1 por monómero. Los sitios de inserción (el extremo N terminal y el bucle activador del enzima, respectivamente) están expuestos al solvente (Jacobson et al., 1994) y son tolerantes a inserciones de péptidos foráneos de gran tamaño (Benito and Villaverde, 1994; Ullmann, BioEssays, 14:201-205 (1992)). A través de la construcción de un híbrido entre esas dos proteínas se dobló el número de péptidos víricos por mol de enzima (Figure 1 A). En la proteína resultante, AB1275VP1, las 8 copias del segmento vírico se presentan en todas las orientaciones espaciales (Figure 1 B). Tanto AB1 y M275VP1 como la proteína híbrida, se producen en *E. coli* con rendimientos altos en un sistema de inducción basado en los promotores *pL-pR*, son proteolíticamente estables y enzimáticamente activas. Las actividades específicas de AB1, M275VP1 and AB1275VP1, calculadas por duplicado después de su purificación, fueron $694 \pm 22,3$, $518 \pm 49,6$ y $272 \pm 69,2$ unidades/mg respectivamente, mientras que la de la proteína parental LACZ (una β -galactosidasa recombinante no quimérica) fue de $1150 \pm 157,6$ unidades/mg. Se observó una cierta pérdida de actividad durante el almacenamiento a -80°C , especialmente en AB1.

Ejemplo 2

Unión de las proteínas de fusión VFA- β -galactosidasa a diferentes tipos celulares.

Hemos mostrado previamente que el ligando celular recombinante expuesto a la superficie de β -galactosidasa, es capaz de unirse eficazmente a células BHK y HeLa a través de un receptor de vitronectina y en menor grado, a través de un receptor de fibronectina (Villaverde et al., 1996). Las propiedades de unión celular de AB1275VP1 se muestran en la Figura 2A. Es evidente una unión selectiva del péptido de adhesión del VFA

a células humanas (HeLa, C33A, Caco-2, Saos-2, C-33 A) y no humanas (3T3, COS7). De entre las líneas celulares probadas, HeLa es la mejor reconocida por el motivo vírico, con una unión inespecífica a LACZ que representa el 10% de la de a AB1275VP1 (Figure 2A). De acuerdo a resultados previos, (Villaverde et al., 1996), el péptido vírico insertado a la interfaz activadora de β -galactosidasa (en M275VP1), reproduce las propiedades de unión celular del bucle G-H de VFA, mucho mejor que la fusión N-terminal en AB1 (Figure 2B). Una observación similar se ha hecho en lo que concierne a la antigenicidad de dicho péptido (Benito et al., 1995).

Ejemplo 3

Internalización de proteínas β -galactosidasa en células en cultivo, dirigida por el péptido de VFA.

La internalización de AB1275VP1 se estudió en células HeLa por microscopía confocal de inmunofluorescencia. Una hora después de la adición de AB1275VP1 soluble al medio de cultivo, la proteína se inmunodetectó en células permeabilizadas con un mAb dirigido contra la proteína VP1 (Figure 3 A, B). Resultados similares se obtuvieron usando un mAb contra β -galactosidasa (no se muestra). Al examinar imágenes seriadas por microscopía confocal, una fracción importante de la proteína inmunodetectada aparece en el interior celular en grupos, mientras que sólo una pequeña parte está en la superficie de la célula (Figure 3C). Estos resultados muestran que el motivo de unión de VFA es no solo capaz de promover la unión, si no también la internalización de la proteína de fusión.

Ejemplo 4

Actividad enzimática de proteínas internalizadas.

Para un análisis más profundo del estado de la proteína β -galactosidasa una vez internalizada, analizamos la actividad β -galactosidasa en cultivos celulares después de la exposición a las proteínas recombinantes AB1275VP1 y LACZ. El total de la actividad de AB1275VP1 asociada a células incrementa durante los primeros 30 min de incubación, detectándose después un ligero descenso (Figure 4A). Después de 15 min, se detectaron valores bajos pero significativos de actividad intracelular, que alcanzaron el 50% de la actividad total, y estabilizándose alrededor de los 120 min. El descenso ulterior de la actividad intracelular, puede deberse a la inactivación del enzima, combinado con una entrada menos eficiente de la proteína unida a tiempos más largos de incubación. Se indican también las cantidades molares del enzima activo calculados a partir de la actividad específica de la proteína. En el experimento control con la proteína LACZ, que no lleva el péptido vírico (panel B), la cantidad de enzima unido permanece casi constante desde el min 15 de incubación. La cantidad molar de LAC estimada es alrededor de 30 veces menor que la estimada para AB1275VP1. Para la proteína LACZ, no se detectó actividad intracelular en nuestra condiciones de ensayo, indicando que la entrada de AB1275VP1 dependiente del péptido vírico corroborando resultados previos con M275VP1 (Villaverde et al., 1996). Durante esos experimentos no se observaron cambios en la morfología celular ni despegamiento de células.

Microscopía de inmunofluorescencia. Las células diana se cultivaron en portaobjetos apropiados en DMEM suplementado con suero fetal de ternera al 10% hasta el 80% de confluencia. Después de reemplazar el medio de cultivo, se añadió alrededor de 20 mg/ml de proteína AB1275VP1 en 100 ml de medio fresco, y se incubó a 37°C durante 3 horas. A distintos tiempos, los portaobjetos se procesaron tal y como está descrito (Hart et al., J.Biol.Chem. 269:12468-12474 (1994)). Un mAb murino comercial dirigido a la β -galactosidasa (de Boehringer Mannheim) y el mAb 3E5 dirigido contra un epítipo B en el bucle G-H del VFA (Capucci et al., Brescia: Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp 32-39 (1984); Mateu et al., C.J.Gen.Virol. 71:629-637 (1990); Benito et al., Bio/Technology 13:801-804 (1995)) se usaron para detectar las proteínas. Las células se incubaron con un anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado a rodamina (de Dako). Las muestras controles se incubaron sólo con anticuerpo conjugado con rodamina. Después de sellar los portaobjetos, se examinaron las muestras con un microscopio láser confocal Leica TCS 4D con una fuente láser de argón-kriptón.

Determinación de la actividad β -galactosidasa. Las células se cultivaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Corning), in DMEM suplementado con 20% de suero fetal de ternera por un máximo de 3 días, hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Los pocillos se lavaron una vez con medio estéril y se añadió 50 ml de muestras de proteína con 20 pmol de AB1275VP1 o LACZ a cada pocillo. A distintos tiempos, los pocillos fueron preparados por duplicado para la determinación de la actividad β -galactosidasa, lavando suavemente con PBS para eliminar en enzima no unido. Para el análisis de la actividad total retenida por las células se añadieron 50 ml de tampón de lisis (0,1% Tritón X-100, 250 mM Tris, pH 8,0). Después de una incubación de 5 minutos, se añadieron 150 ml de ONPG a 4 mg/ml ONPG en tampón Z (0,06 M Na_2HPO_4 , 0,04 M NaH_2PO_4 , 0,01 M KCl, 0,001 M MgSO_4 , 0,04 M 8-mercaptoethanol, pH 7,0, (Miller, J.H., in Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 352-355 (1972)) y las mezclas fueron incubadas durante 30 min. La reacción se paró con 50 ml de 1M Na_2CO_3 . La absorbancia se determinó a 405 nm en un lector de ELISA de microtitulación. La actividad extracelular del enzima unido se determinó como se ha indicado pero añadiendo PBS en vez del tampón de lisis. No se observó lisis celular durante el ensayo. La actividad intracelular se obtuvo por la diferencia de la total y la extracelular para cada tiempo de incubación. Dado que la actividad β -galactosidasa en proteínas de fusión es afectada por la presencia de detergentes, también de determinó la misma en presencia del tampón de lisis. Se usaron los factores de corrección obtenidos (generalmente entre 1,9 y 2,2) a las muestras tratadas con Tritón X-100. Para seguir la internalización de proteína AB1275VP1 unida a células, los pocillos se lavaron durante 60 min después de añadir la proteína y se trataron como se describe más arriba. En este caso, se

usaron 100 ml de una solución de ONPG para un tiempo de reacción de 60 min.

Como método alternativo, se incubaron células con AB1275VP1 paralelamente a 4 y 37°C para discriminar entre unión celular e internalización. A distintos tiempos, las células se enfriaron a 4°C y la proteína no unida se eliminó por lavados repetidos con medio estéril a 4°C. La proteína unida externamente se inactivó por proteólisis suave durante 45 min a 4°C, con tripsina a 5 g/l en presencia de 1mM EDTA. Después de una centrifugación, los sedimentos se lavaron con medio de cultivo para inactivar la proteasa, se resuspendieron en PBS, las células se lisaron con tampón de lisis, y la actividad β -galactosidasa se midió como se indica arriba. A 37°C, se había detectado inactivación de AB1275VP1 dependiente del tiempo de incubación. Por ello, se incubaron alíquotas de la proteína en medio estéril a 37°C y se midió su actividad enzimática a distintos tiempos. La inactivación relativa osciló entre el 46,8% a los 30 min y el 92,7% a los 150 min. La desviación estándar de las actividades obtenidas fue siempre menor del 10% del valor medio. Esta inactivación diferencial se tuvo en cuenta para el análisis de los datos.

Ensayos de expresión de ADN

Se construyó una proteína β -galactosidasa quimérica, derivada de JX249A, que permitiese la unión y transporte intracelular de ADN. JX249A es un variante de M275VP1, en el que el mismo péptido vírico de unión celular del VFA se encuentra insertado entre las posiciones 249 y 250 (Feliu et al., en preparación). El gen *lacZ* recombinante se aisló por digestión del plásmido pJX249A, con los enzimas EcoRI y NcoI. Después de rellenar los extremos cohesivos con Klenow, se introdujo dicho fragmento en el vector de expresión pTrc99A, linerizado por la diana *SmaI*. La posterior introducción de dos oligonucleótidos sintéticos complementarios codificantes de 10 lisinas consecutivas se realizó digiriendo el vector resultante con KpnI y EcoRI. La inserción de este fragmento sintético recuperó la fase de lectura del gen *lacZ* quimérico en el vector resultante. Para los ensayos, diferentes cantidades de la proteína codificada JX249AL, se unieron a 4 μg de ADN del vector pGL3 (Promega) durante 30 min a temperatura ambiente en medio OptiMEM, en un volumen final de 400 μl . Después de la incubación, se añadió más medio optiMEM hasta 800 μl . 200 μl de estas mezclas se añadieron a cultivos de células CaCo-2 creciendo hasta 50% de confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos, después de lavarlas con optiMEM. Cada ensayo se realizó por cuatuplicado. Como control negativo, se transformaron cultivos en las mismas condiciones con 1 μg de pGL3, y como control positivo, con la misma cantidad acompañada con lipofactAMINA (Gibco) a 12 μg por 1 μg de ADN. Después de una incubación a 37°C durante toda la noche, se eliminó el medio de la placa y se añadió 1 ml de medio estéril de cultivo, para prolongar la incubación durante otro día adicional. Después de lavar con PBS, se añadió 200 μl de tampón de lisis por pocillo, se congelaron las placas a -80°C durante 1 h y se midió la actividad luciferasa utilizando sustrato comercial (Promega), en un luminómetro convencional.

Fig. 3. Immunodetección de proteína recombinante internalizada. La proteína AB1275VP1 se inmunodetectó en células HeLa usando el mAb 3E5 anti-VP1, 90 min después de su adición al cultivo (panel B). En el panel A se muestra un control sin anticuerpo 3E5. En el panel C, se muestra una serie de microfotografías confocales de células marcadas (de izquierda arriba a derecha abajo) que revela la localización vesicular de la proteína recombinante. El anticuerpo 3E5 en líquido ascítico se usó a una dilución 1:4000. El título de este mAb en ELISA es de 1:16000.

Fig. 4. Cinética de actividad β -galactosidasa total e intracelular en células HeLa después de incubar con AB1275VP1 (A) o LACZ (B). La dependencia temporal de la actividad intracelular de AB1275VP1 se confirmó con un ensayo ANOVA de dos factores ($p < 0,01$). A partir de la actividad específica, se estimó las cantidades molares de proteína.

Fig. 5. A: Inactivación por tripsina de proteína AB1275VP1 unida externamente a 4°C. B: Dependencia temporal de actividad β -

galactosidasa retenida por células HeLa durante la exposición a proteína AB1275VP1 a 4° y 37°C. La actividad enzimática se determinó después de inactivación por tripsina y lisis celular. Un ensayo ANOVA de dos factores mostró una dependencia temporal significativa entre la actividad retenida por las células a 4 y 37°C ($p < 0,01$).

Fig. 6. Internalización de proteína AB1275VP1 unida. Evolución temporal de actividad β -galactosidasa extracelular e intracelular de proteína AB1275VP1 retenida por células HeLa 1 h después de la exposición a la misma.

Fig. 7. Niveles de expresión del gen de la luciferina, transportado en el plásmido pGL3, respecto a los logrados usando lipofectAMINA. Cantidades crecientes de JX249AL (38 μ g en 1, 70 μ g en 2 y 140 μ g en 3), se usaron para formar complejos con 4 μ g de ADN plasmídico. La barra pGL3 indica la expresión génica de la misma cantidad de ADN, en ausencia del transportador proteico. El control positivo LipofectAMINA se usó a 48 μ g por 4 μ g de ADN.

Para excluir la posibilidad de que la actividad intracelular fuese aparente y debida a la reactivación de proteína externa unida por la solubilización de la membrana, más que a una verdadera internalización, llevamos a cabo un segundo experimento con incubación paralela a 4 y 37°C. La unión a integrinas tiene lugar con normalidad a 4°C, pero la internalización mediada por integrinas es eficazmente inhibida a esta temperatura (Wickham. et al., Cell 73:309-319 (1993)). Después de un tratamiento suave con tripsina, la actividad externa asociada a membrana se reduce a niveles de fondo (Figure 5A). Esto permite la medida de la actividad interna por comparación de las actividades totales en células incubadas a 4°C (en las que no hay internalización) con las de las incubadas a 37°C (en las que se da internalización) (Figura 5B). Aunque la cinética de actividad intracelular difiere ligeramente de la mostrada en la Figura 4, muestra claramente que la mayoría de β -galactosidasa retenida por las células no está asociada a membrana sino que es realmente interna.

Para investigar la cinética de la actividad del enzima unido y el internalizado en las mismas células, se usó el primer método de análisis descrito arriba, y la actividad intracelular se obtuvo por la diferencia entre la total y la externa. En la figura 6 se muestra que después de la exposición de las células a la proteína AB127VP1 durante 1 h, y después del lavado de la proteína unida e incubación a 37°C, la cantidad de actividad externa decrece a la vez que se incrementa la actividad intracelular. El descenso posterior puede ser interpretado como resultado de inactivación enzimática. La similitud entre la cinética temprana de internalización de enzima unido, y la cinética de internalización mostrada en la Figura 5, parece sugerir que el valor más alto de actividad interna en el min 30, que se muestra en la Figura 4A, no es representativo. Aunque la dependencia temporal de la cinética mostrada en la Figura 6 no es significativa ($p > 0,1$) en un ensayo ANOVA de dos factores), estos resultados, junto con los mostrados en las Figuras 4 y 5, sugieren que la vida media del enzima AB1275VP1 activo e internalizado puede estar entre 1 y 2 h.

Ejemplo 5 Entrega dirigida y expresión de ADN foráneo

Dado que el enzima β -galactosidasa conteniendo péptidos víricos de unión celular, es internalizado y estable durante un cierto tiempo en el interior celular, se evaluó la posibilidad de que complejos derivados de esta proteína con ADN, pudiesen acceder al núcleo celular, y por tanto permitir la expresión de un ADN foráneo transportado por las proteínas recombinantes. Por ello, a la proteína JX249A, que contiene el péptido del VFA insertado entre las posiciones 249 y 250 del enzima, se le fusionó un péptido conteniendo 10 lisinas consecutivas que permitiesen su unión al ADN, generando la proteína JX249AL. La proteína JX249A, es significativamente más estable que M275VP1 (Feliu et al., manuscrito en preparación). En la Figura 7 se indican los niveles de expresión génica en células CaCo-2, medidos por un ensayo de luciferina, después de ser expuestas a los complejos ADN-

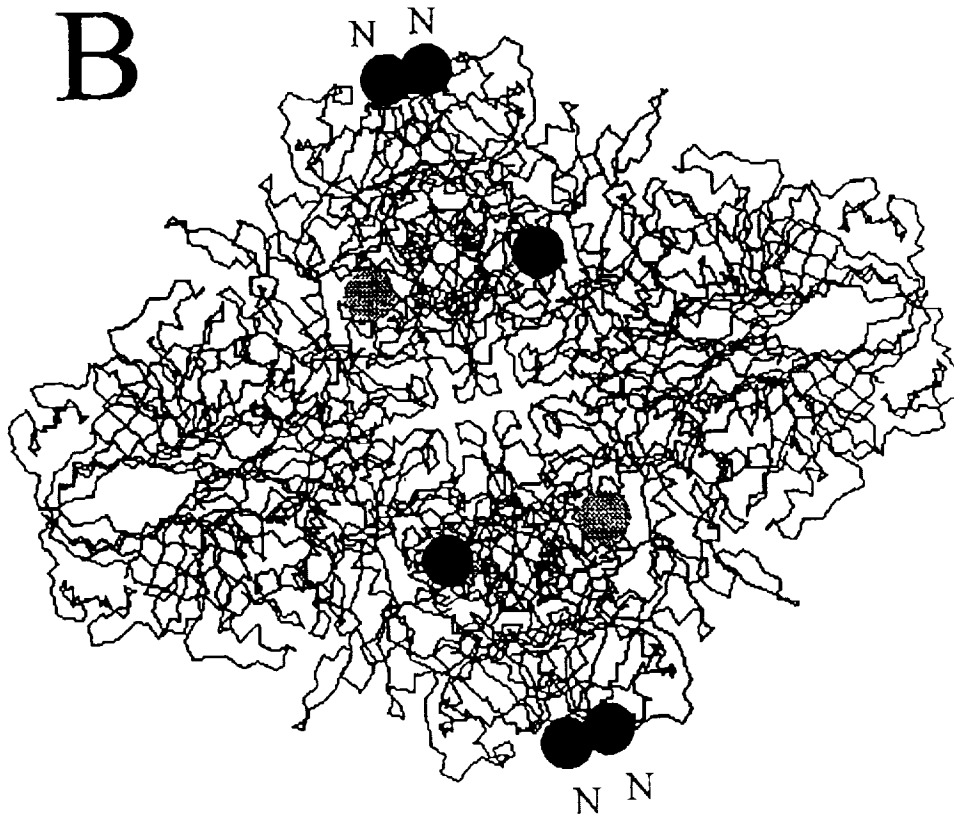
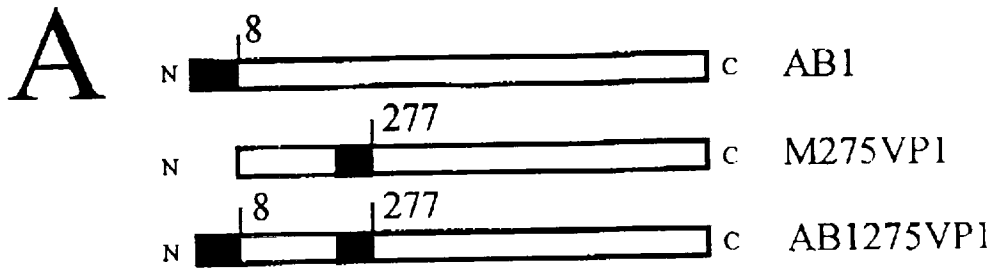
proteína. La presencia de la proteína recombinante permite la expresión génica a partir del plásmido pGL3, hasta unos niveles del 4% respecto a la conseguida con complejos usando LipofectAMINA. Esto muestra que la proteína recombinante con el péptido vírico de unión celular es capaz de dirigir la internalización de ADN hasta el núcleo y su posterior expresión, y que el principio expuesto aquí puede tener aplicaciones en terapia génica, antisentido, o en aquellas situaciones en que se quiera introducir moléculas de ADN en células o tejidos diana.

Descripción de las figuras

Fig. 1. **A** Localización de los segmentos de VFA (como barras negras) en los monómeros de las proteínas AB1, M275VP1 y AB1275VP1. La proteína bacteriana se muestra como una barra blanca. Los números indican los residuos de β -galactosidasa que flanquean el péptido vírico, y las letras los extremos amino (N) y carboxi (C). Se dan mas detalles de esas proteínas en otro sitio (Benito et al., 1995). **B** Representación esquemática de la proteína AB1275VP1 basada en la estructura tridimensional de β -galactosidasa. Cada monómero contiene 2 péptidos de unión celular dirigida de VFA (mostrados como esferas), expuestos al solvente. Las esferas grises indican péptidos expuestos en la cara oculta de la molécula. Los sitios de fusión en el extremo amino terminal también se indican (N). La secuencia del péptido vírico insertada en la interfaz activadora del enzima (entre las posiciones 275 y 276) se muestra abajo. Los números indican los residuos de la VP1 del VFA. Los residuos marcados con asteriscos son aquellos críticos para la unión del aislado del VFA usado en este trabajo (Mateu et al., J. Biol. Chem. 271:12814-12819 (1996)). El péptido insertado en el extremo amino terminal incluye también este segmento y cubre los residuos del 129 al 185 de la proteína VP1. El esquema se ha generado con el programa RasMol v. 2.6, a partir de las coordenadas atómicas de la β -galactosidasa de *E. coli* (Jacobson et al., 1994).

Fig. 2. Unión celular de proteínas β -galactosidasa-quiméricas mediada por el péptido de VFA. **A**: Unión a diferentes líneas celulares de AB1275VP1 y LACZ a los 90 min de incubación. Un ensayo ANOVA de dos factores muestra diferencias significativas entre la unión de AB1275VP1 y la del control LACZ, y la de la unión de proteínas recombinantes portadoras del motivo RGD vírico a diferentes líneas celulares ($p < 0,01$ para ambos análisis). **B**: Células HeLa de unión promovida por AB1, M275VP1 y AB1275VP1. Un ensayo ANOVA de dos factores indica diferencias significativas entre la unión a células de distintas proteínas ($p < 0,01$), y un ensayo Newman-Keuls muestra diferencias significativas entre la unión de AB1 y M275VP1 o AB1275VP1 ($p < 0,01$) pero no entre las dos últimas ($p < 0,01$).

FIG.1



134 TTYTASARGDLAHLTTTHARHLP 156
* * * * *

REIVINDICACIONES

1. Proteína híbrida para utilizar en la liberación dirigida de un compuesto a una célula humana o animal, que comprende a) un péptido y b) un compuesto; **caracterizada** en que dicho péptido es un péptido vírico de unión celular dirigida o una variante modificada de dicho péptido vírico de unión celular dirigida capaz de unirse a una célula; de manera que al poner en contacto dicha proteína híbrida con una célula humana o animal, dicha proteína híbrida se internaliza en la célula y es activa dentro de ella.

2. Composición farmacéutica que comprende una proteína híbrida para utilizar en la liberación dirigida de un compuesto a una célula humana o animal, que incluye a) un péptido y b) un compuesto; **caracterizada** en que dicho péptido es un péptido vírico de unión celular dirigida o una variante modificada de dicho péptido vírico de unión celular dirigida capaz de unirse a una célula; de manera que al poner en contacto dicha proteína híbrida con una célula humana o animal, dicha proteína híbrida se internaliza en la célula y es activa dentro de ella.

3. Procedimiento para la obtención de una proteína híbrida capaz de la liberación dirigida de un compuesto activo a una célula, **caracterizado** en que comprende las siguientes etapas:

- (i) identificación de un péptido vírico de unión celular dirigida capaz de unirse a una célula; opcionalmente,
- (ii) modificación de dicho péptido vírico identificado de unión celular dirigida para construir una variante de dicho péptido vírico de unión celular dirigida, todavía capaz de unirse a una célula;
- (iii) construcción de una proteína híbrida que comprende:
 - a) el péptido vírico de unión celular dirigida de la etapa i) o una variante de dicho péptido vírico de unión celular dirigida de la etapa ii) y
 - b) un compuesto;
- (iv) poner en contacto la proteína híbrida de la etapa iii) con una célula; teniendo lugar
- (v) la internalización de dicho compuesto en la

célula, siendo activo dentro de ella.

4. Proteína híbrida según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dicho péptido vírico de unión celular dirigida se puede obtener a partir de un picornavirus, en particular a partir del virus de la fiebre aftosa (VFA).

5. Proteína híbrida según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dicho péptido vírico de unión celular dirigida se puede obtener a partir de un adenovirus (Ad).

6. Proteína híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 ó 5, **caracterizado** por el hecho de que dicho péptido vírico de unión celular dirigida comprende el motivo de aminoácido RDG.

7. Proteína híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4-6, **caracterizado** por el hecho de que dicho péptido vírico de unión celular dirigida se une a una integrina en una célula, en particular a un receptor de vitronectina en una célula.

8. Utilización de una proteína híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4-7 para la preparación de una composición farmacéutica para la terapia génica o enzimática de humanos o animales.

9. Procedimiento para la liberación dirigida de un compuesto a una célula según la reivindicación 3, **caracterizado** en que dicho contacto entre la proteína híbrida y la célula se realiza mediante la incubación de dicha proteína híbrida en un cultivo celular que comprende dicha célula.

10. Utilización de una proteína híbrida según la reivindicación 8 **caracterizada** en que dicha composición farmacéutica es un cultivo celular que contiene dicha proteína híbrida.

11. Proteína híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** por el hecho de que dicho compuesto es una proteína activa.

12. Proteína híbrida según la reivindicación 11, **caracterizado** por el hecho de que dicha proteína híbrida que comprende dicho péptido vírico de unión celular dirigida y dicha proteína activa se obtiene como un polipéptido recombinante.

13. Proteína híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** por el hecho de que dicho compuesto es una molécula de ADN.

FIG.3

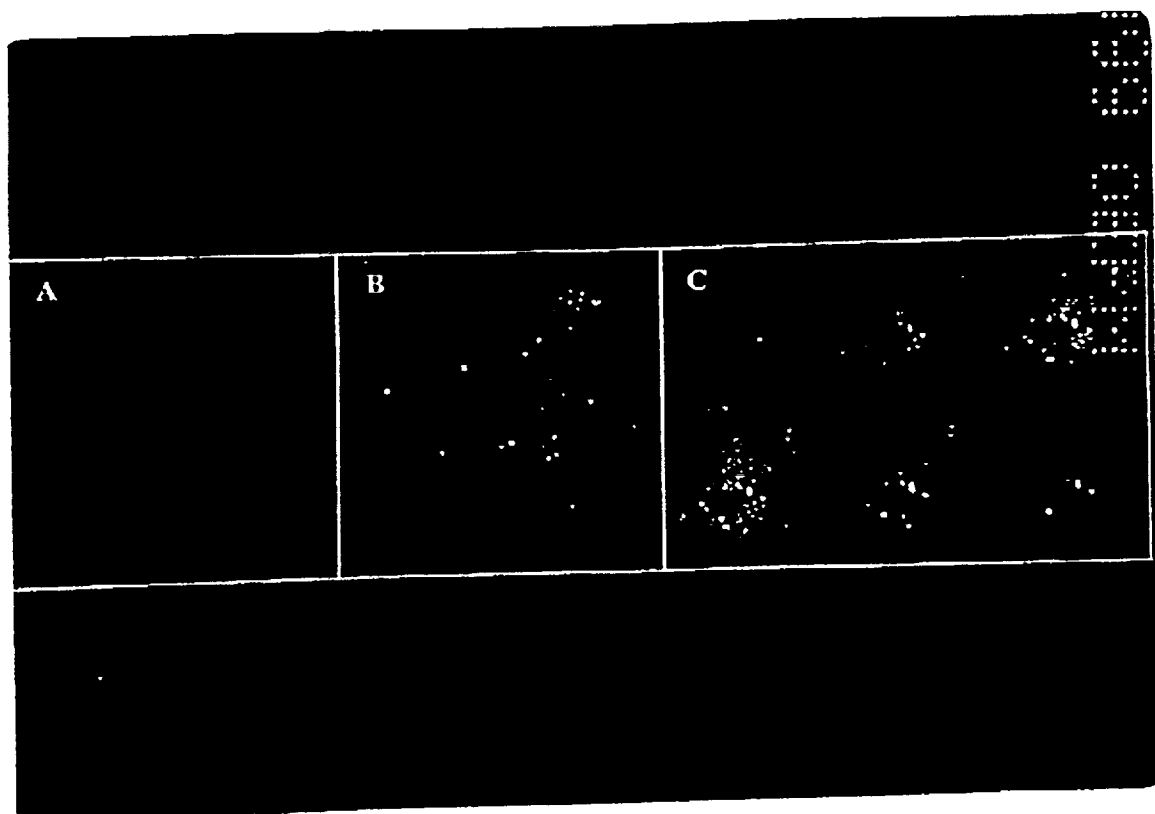
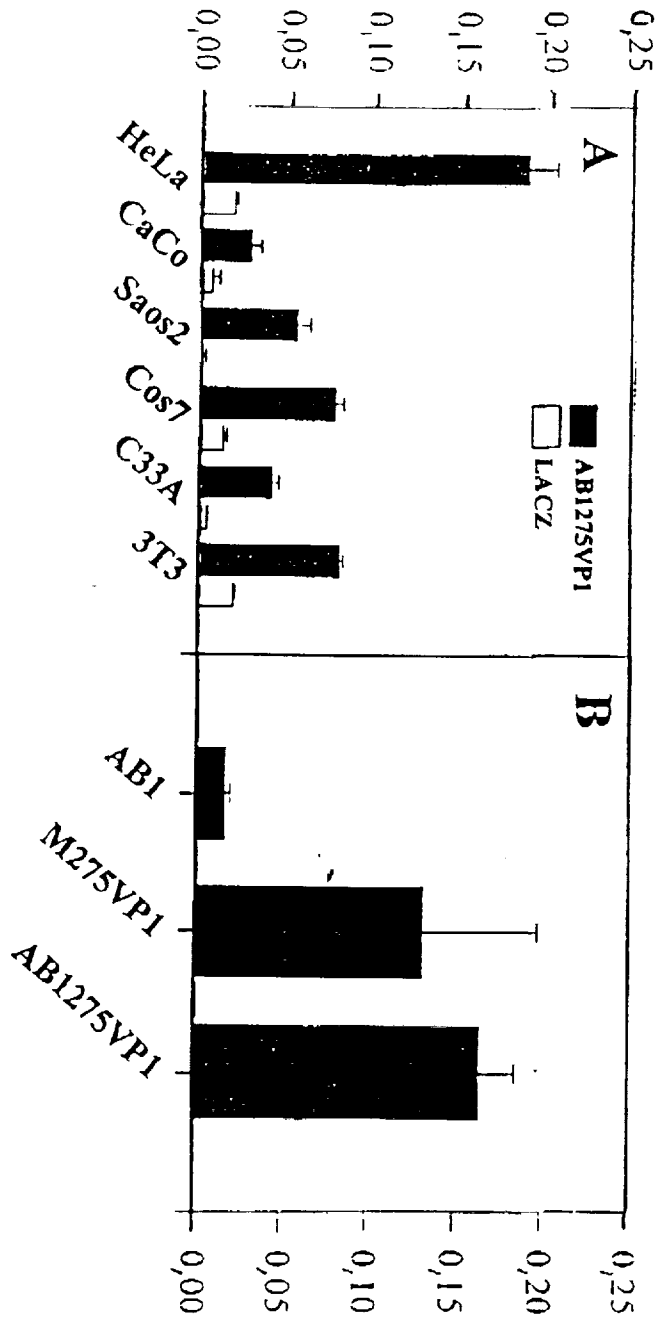


FIG. 2

Unión celular ($A_{570}/10^5$ células)



Unión celular ($A_{570}/10^5$ células)

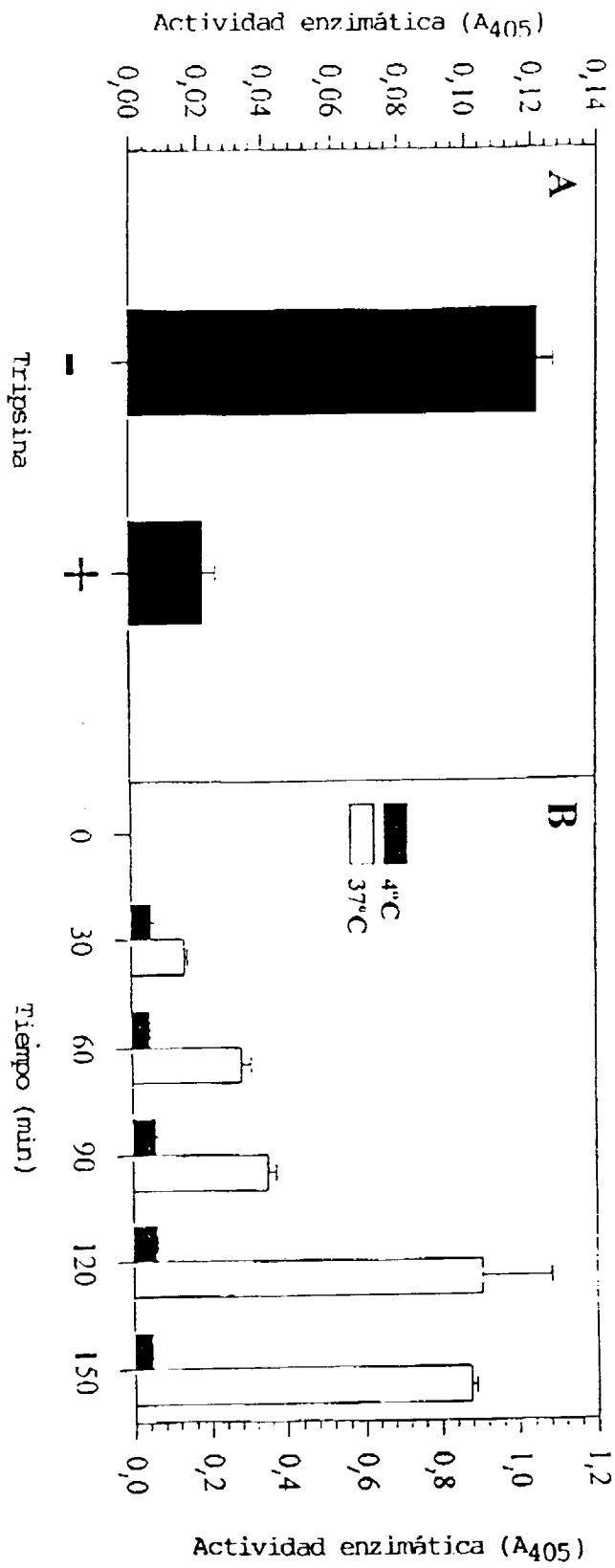


FIG.5

FIG.4

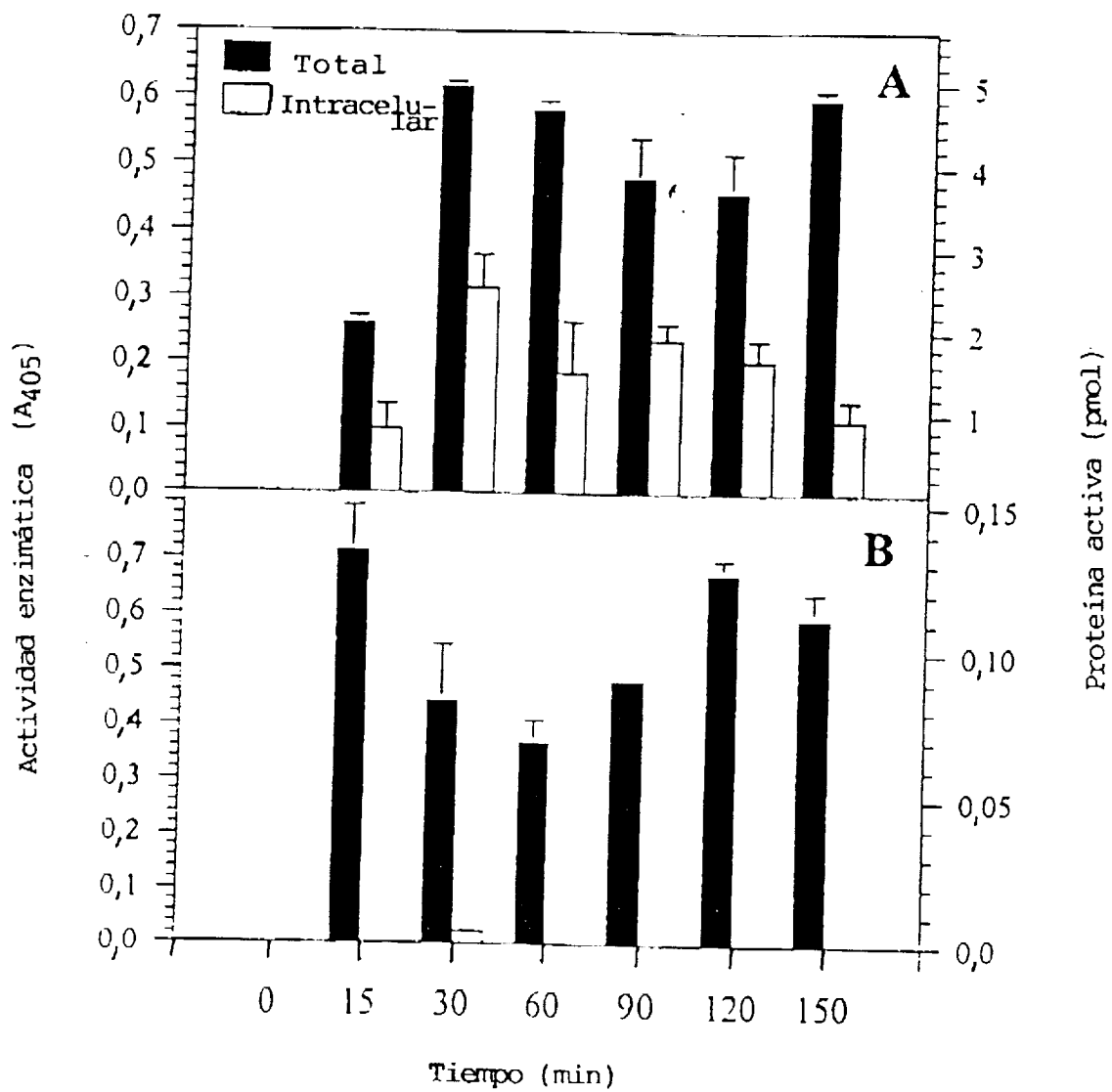


FIG.7

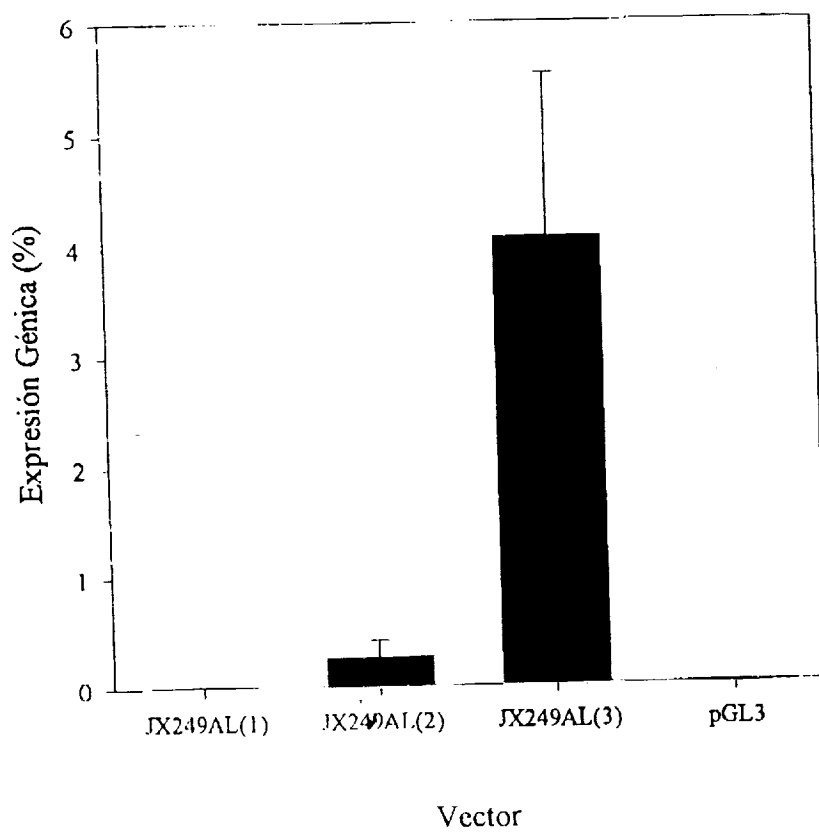
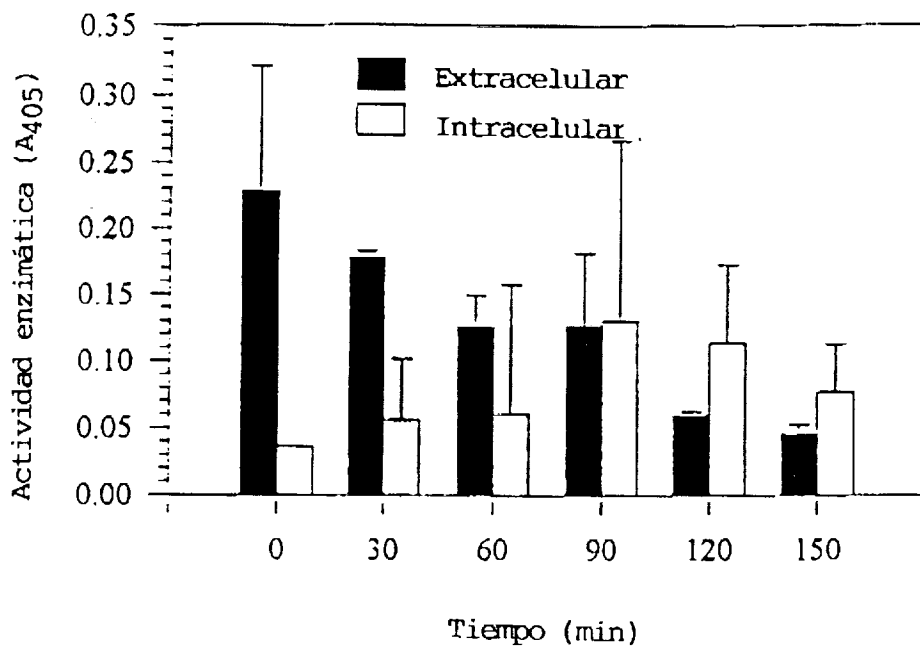


FIG.6





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 148 063

② N.º solicitud: 009800476

③ Fecha de presentación de la solicitud: 06.03.1998

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl. 7: C07K 14/075, 14/09, A61K 48/00, A61P 43/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	WO 9526412 A1 (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 05.10.1995, todo el documento.	1-3,5-13 4
Y	T. JACKSON et al. "Arginine-Glycine-Aspartic Acid-Specific Binding by Foot-and-Mouth Disease Viruses to the Purified Integrin $\alpha\beta 3$ In Vitro". JOURNAL OF VIROLOGY. Noviembre 1997, Vol. 71, nº 11, páginas 8357-8361. Todo el documento.	4
X Y	S.L. HART, et al. "Cell Binding and Internalization by Filamentous Phage Displaying a Cyclic Arg-Gly-Asp-containing Peptide". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 29 de abril de 1994, Vol. 269, nº 17. páginas 12468-12474. Todo el documento.	1-3,5-13 4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.08.2000

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1