



Organización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

00-9307

54. TITULO Peptidos artificiales que tienen actividad
superficial y el uso de los mismos en la preparación
de un tensioactivo artificial

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K³⁸/16, C07K¹⁴/00

71. SOLICITANTE Chiesi Farmaceutici S.p.A.

DOMICILIO Parma, Italia

74. APODERADO Dilia Maria Rodriguez D' Aleman

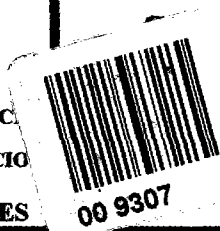
22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C. Febrero 10, 2000

63

REPUBLICA DE COLOMBIA

SIC SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



CITID DE
E
7

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombre y Apellidos o Razón Social

CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.

Nº de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

ITALIA

Departamento o Estado

PARMA

Ciudad

Via Palermo, 26/A, Parma, Italia

Dirección

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

Dirección

Carrera 11 numero 93-43 oficina 404, Santafe de Bogotá, S.A.

DATOS DEL INVENTOR Son (5) Inventores
Nacionalidad

(72) Nombre del Inventor (es)

- 1) CURSTEDT Tore, Sueco
- 2) JOHANSSON Jan, Sueco
- 3) JÖRNVALL Hans, Sueco
- 4) ROBERTSON Bengt, Sueco
- 5) VENTURA Paolo, Italiano

Dirección y Domicilio

TODOS RESIDENTES EN: VIA PALERMO, 26/A, PARMA, ITALIA

Identificación

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención **PÉPTIDOS ARTIFICIALES QUE TIENEN ACTIVIDAD SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACIÓN DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL**

PRIORIDAD REIVINDICADA

Sí ☒

No ☐

(33) ITALIA

(32) FEBRERO 12, 1999

(31) N° Solicitud MI99A000275

Fuente Normativa: Convenio de París Art.4°

CLASIFICACION INTERNACIONAL

ACOLK³⁸/116, COTK¹⁴/00

SOLPA299

GMS/ SRR

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

PÉPTIDOS ARTIFICIALES QUE TIENEN ACTIVIDAD SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACIÓN DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL

Se describen péptidos artificiales análogos de la SP-C que tienen actividad superficial, y su uso para la preparación de tensioactivos artificiales útiles en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (RDS) y otras enfermedades relacionadas a deficiencia o disfunción de tensioactivos.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica ☐
- Poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C. ☐
- Recibo de la tasa respectiva ☒
- Si se reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada) ☐
- Traducción oficial ☐
- Capítulo descriptivo ☒
- Dibujos, planos necesarios ☒
- Capítulo reivindicatorio ☒
- Tarjeta archivo propietario según formato ☒
- Tarjeta archivo temático según formato ☒
- Extracto para resumen o para publicación según formato ☒
- Arte final 12 x 12 cms ☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD


FIRMA DEL APODERADO

C.C. 41.654.882 TP N° 20824 CSJ

4

PÉPTIDOS ARTIFICIALES QUE TIENEN ACTIVIDAD SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACIÓN DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL

La presente invención proporciona nuevos péptidos artificiales que tienen actividad superficial. En particular, la invención proporciona análogos del SP-C, los cuales, una vez combinados con lípidos apropiados, son particularmente efectivos para reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido.

Así, los péptidos de la invención se pueden usar en combinación con lípidos, y en forma opcional en combinación con SP-B o un análogo activo del mismo o un sustituto del SP-B, para preparar tensioactivos artificiales útiles en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (RDS), otras deficiencias o disfunciones de los tensioactivos, enfermedades pulmonares relacionadas tales como la neumonía, bronquitis, asma, síndrome de aspiración de meconio, y otras enfermedades tales como la otitis media serosa (adhesiva).

Antecedentes de la Invención

Los tensioactivos pulmonares reducen la tensión superficial en la interfase aire-líquido del recubrimiento alveolar, previniendo que los pulmones colapsen al final de la expiración. La deficiencia de tensioactivo es un desorden común en los infantes prematuros y causa el síndrome de dificultad respiratoria (RDS) el cual puede ser tratado en forma efectiva con tensioactivos naturales extraídos de pulmones de animales (Fuliwara, T. and Robertson, B. (1992) en: Robertson, B., van Golde, L.M.G, and Batenburg, B. (Eds.) Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice, Amsterdam, Elsevier, pp. 561-592). Los principales componentes de estas preparaciones son fosfolípidos tales como 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina (DPCC), fosfatidiglicerol (PG) y las proteínas tensioactivas hidrofóbicas B y C (SP-B y SP-C). Las proteínas tensioactivas hidrofilicas SP-A y SP-D las cuales son lectinas colagenosas tipo C (dependientes del Ca^{2+}) que se piensa que actúan en el sistema de defensa huésped, no están incluidas normalmente en las preparaciones tensioactivas debido a los procedimientos de extracción con solventes orgánicos empleados.

Las SP-B y SP-C constituyen solo aproximadamente del 1 al 2 % de la masa de tensioactivos, pero aún así son capaces de ejercer una mejora dramática sobre la actividad superficial, comparada a las preparaciones con lípidos puros (Curstedt, T., et

al. (1987) Eur. J. Biochem. **168**, 255-262; Takahashi, A., Nemoto, T. and Fujiwara, T. (1994) Acta Pediatr. Jap. **36**, 613-618). Se han determinado las estructuras primaria y secundaria de las SP-B y SP-C y una estructura terciaria de la SP-C en solución (ver 4). La SP-B está compuesta de dos cadenas de polipéptido idénticas de 79 aminoácidos, conectadas por un puente intercadenas del tipo disulfuro (Curstedt, T. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 2985-2989; Johansson, J. Curstedt, T. and Jörnvall, H. (1991) Biochemistry **30**, 6917-6921). Cada cadena monomérica tiene tres puentes disulfuro intracadena y por lo menos cuatro espirales anfipáticas que exhiben una cara polar y una cara no polar a través de la cual la SP-B puede interactuar con dos bicapas lipídicas trayéndolas a una proximidad cercana (Andersson, M. et al. (1995) FEBS Lett. **362**, 328-332). La SP-C es una lipoproteína compuesta de 35 residuos de aminoácidos con un dominio de hélices α entre los residuos 9-34 (Johansson, J. et al. (1994) Biochemistry **33**, 6015-6023). La hélice está mayormente compuesta de residuos de valilo y está incrustada en la bicapa lipídica y orientada en paralelo con las cadenas acilo lipídicas (Vandenbussche, et al. (1992) Eur. J. Biochem. **203**, 201-209). Los grupos palmitoilo están unidos en modo covalente a residuos de cisteína en posiciones 5 y 6 en el extremo N-terminal del péptido (Curstedt, T. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 2985-2989). Los dos residuos conservados cargados positivamente, arginina y lisina, en las posiciones 11 y 12, posiblemente interactúan con los grupos principales con carga negativa de la membrana lipídica aumentando así su rigidez. La rigidez de la interacción lípido-péptido se puede disminuir hacia el extremo C-terminal, ya que éste contiene grupos hidrofóbicos o pequeños, haciendo esta parte potencialmente más móvil en una bicapa de fosfolípido. Se piensa que la SP-C tiene influencia sobre el espesor y fluidez de los lípidos de los alrededores vía la extremadamente estable hélice de polivalilo (Johansson, J. and Curstedt, T. (1997) Eur. J. Biochem. **244**, 675-693).

Estado de la técnica

Debido a que las preparaciones tensioactivas obtenidas de los tejidos animales presentan algunas desventajas, como su disponibilidad en cantidades limitadas y la posibilidad de que contengan agentes infecciosos e induzcan reacciones inmunológicas, se han hecho intentos para crear tensioactivos artificiales (Johansson,

J. and Curstedt, T. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**, 675-693; Johansson, J. et al. (1996) *Acta Pediatr.* **85**, 642-646), usualmente a partir de lípidos sintéticos y proteínas hidrofóbicas.

Los trabajos previos han demostrado que la SP-C sintética no puede plegarse como el péptido nativo en una conformación α -helicoidal necesaria para una óptima actividad superficial (Johansson, J. et al. (1995) *Biochem.J.* **307**, 535-541), y por lo tanto no interactúa en forma apropiada con los lípidos del tensioactivo.

En consecuencia, los análogos sintéticos de la SP-C no se pliegan como el péptido nativo y no interactúan en forma apropiada con los lípidos tensioactivos. Para sortear este problema se han hecho muchos intentos para modificar la secuencia, por ejemplo, reemplazando todos los residuos helicoidales de Val en la SP-C nativa con Leu, el cual favorece fuertemente la conformación α -helicoidal. El análogo transmembrana correspondiente, SP-C(Leu), mostró una buena dispersión en la interfase aire-líquido cuando se combina con DPPC:PG:PA (68:22:9) (p/p/p). Sin embargo, el máximo valor de tensión superficial durante la compresión cíclica de la superficie (γ_{max}) fue significativamente mayor que el del tensioactivo nativo. Además no fue posible preparar mezclas lípido-péptido de mayores concentraciones que aproximadamente 20 mg/ml, probablemente debido a la formación de oligómeros del péptido (Nilsson, G. (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**, 116-124). Otros han sintetizado análogos de SP-C polileucina bioactivos de diferentes longitudes (Takei, T. et al. (1996) *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1550-1555). En los últimos estudios no se informaron problemas de auto oligomerización ni problemas en la producción de muestras de alta concentración de lípidos.

Diferentes publicaciones tratan el problema de proporcionar análogos peptídicos de los péptidos tensioactivos naturales dando una cantidad de soluciones diferentes. Entre esas publicaciones, las WO93 21225, la EP 733 645, y la WO96 17872, a nombre de Tokyo Tanabe, revelan péptidos análogos de la SP-C natural, los cuales difieren en general del péptido nativo en relación a la secuencia de la parte N-terminal.

Las Solicitudes de Patente del Scripps Research Institute WO89 06657 y WO92 22315 revelan análogos de la SP-B que tienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos e

hidrofílicos alternados. Entre otros, se reivindica un péptido que alterna residuos de Leucina y Lisina (KL₄).

Clercx, A. et al. eur. J. Biochem **229**, 465-72, 1995, revela péptidos de diferentes longitudes que corresponden al N-terminal de la SP-C porcina y péptidos híbridos derivados de la SP-C porcina y bacteriorhodopsina.

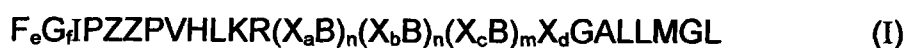
Johansson, J. et al. Biochem.J. **307**, 535-541, 1995, revelan péptidos sintéticos que difieren de la SP-C porcina nativa por la sustitución de algunos aminoácidos.

La WO89 04326 a nombre de California Biotechnology - Byk Gulden, y la WO91 18015 a nombre de California Biotechnology - Scios Nova, revelan análogos de la SP-C que contienen una secuencia N-terminal inicial en la cual los dos Cys de la SP-C natural son reemplazados por dos Ser.

Descripción de la invención

Ahora se ha encontrado que los péptidos análogos de la SP-C que combinan las siguientes características: i) sustitución de los residuos Val con otros residuos neutros hidrofóbicos; ii) sustitución de los residuos Cys por residuos Ser; iii) reemplazo de algunos de los residuos de aminoácidos neutros con residuos voluminosos o polares, muestran propiedades particularmente favorables para la reducción de la tensión superficial. En particular se ha encontrado que la última característica, en virtud de las cargas positivas que confieren los residuos polares o el impedimento estérico que confieren los sustituyentes voluminosos, permiten evitar la auto oligomerización.

Como se indica a continuación, de acuerdo a un primer aspecto la invención proporciona análogos de SP-C que tienen la fórmula general (I), usando el código de aminoácidos de una letra:



en la cual:

X es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por V, I, ^{no es hidrofóbico} L, Nle (norleucina);

B es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por ornitina, K, I, W, F, Y, Q, N;

Z es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por S, C, F donde los residuos Ser o Cys están unidos en forma opcional vía uniones éster o tioéster con grupos acilo que contienen de 12 a 22 átomos de carbono unidos.

- a es un entero de 1 a 19
- b es un entero de 1 a 19
- c es un entero de 1 a 21
- d es un entero de 0 a 20
- e es 0 o 1
- f es 0 o 1
- n es 0 o 1
- m es 0 o 1

con las condiciones :

$$n + m > 0,$$

$$f \geq e$$

$(X_a B)_n (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$ es una secuencia que tiene un total de 22 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 22.

Los péptidos preferidos de la Fórmula (I) tienen las siguientes secuencias:

(Ia) FGIPSSPVHLKRX₄BX₄BX₄BXGALLMGL

(Ib) FGIPSSPVHLKRX₅BX₅BX₄GALLMGL

(Ic) FGIPSSPVHLKRX₄BX₁₁GALLMGL

(Id) FGIPSSPVHLKRX₈BX₇GALLMGL

(Ie) FGIPSSPVHLKRX₁₁BX₄GALLMGL

Entre las secuencias (Ia) - (Ie), aquellas que tienen B = Lys o Phe y X = Leu, Ile o Nle son las preferidas.

De acuerdo con las realizaciones preferidas, los péptidos de la fórmula (Ia) - (If) tienen respectivamente las siguientes secuencias:

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLKILLKLGALLMGL [SP-C (LKS)]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₁]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLLILLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₂]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLLKLILLILGALLMGL [SP-C (LKS)₃]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₄]

FGIPSSPVHLKRLILFLLLLFILLFLGALLMGL [SP-C (LFS)]

En una realización de la invención de mayor preferencia, los residuos Ser están unidos en unión covalente con grupos acilo que contienen de 12 a 22 átomos de carbono.

Los péptidos de la fórmula (I) se pueden preparar por métodos de síntesis o técnicas recombinantes.

Los métodos de síntesis convencionales están descritos en, por ejemplo, Schroeder et al., "The peptides", vol 1, Academic press, 1965; Bodzanszky et al., "Peptide synthesis", Interscience Publisher, 1996; Baramy & Merrifield, "The peptides; Analysis, Synthesis, Biology", vol 2, chapter 1, Academic Press, 1980. Dichas técnicas incluyen síntesis de péptidos en fase sólida, en solución, métodos de síntesis de química orgánica, o cualquier combinación de los mismos.

Los péptidos S- u O- acilados son preferiblemente sintetizados por tratamiento de los péptidos no acilados con cloruro de acilo en ácido trifluoroacético puro, como lo describe Yousefi-Salakdeh et al. Biochem. J., 1999, **343**, 557-562. Luego de su síntesis y purificación, los péptidos sintéticos fueron caracterizados desde el punto de vista bioquímico y biofísico como se informa en la siguiente sección de "Ejemplos".

La actividad de los péptidos de la invención en la reducción de la tensión superficial ha sido evaluada en combinación con lípidos y fosfolípidos, SP-B, análogos de la SP-B, o sustitutos de la SP-B. En particular, los péptidos han sido combinados con DPPC (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) / PG (fosfatidiglicerol) / PA (ácido palmítico) con o sin SP-B, un análogo activo de los mismos y polimixinas.

Los resultados de los ensayos de actividad superficial de burbuja pulsante muestran claramente que los péptidos sintéticos de acuerdo con la presente invención disminuyen fuertemente la tensión mínima y máxima durante la compresión cíclica de superficie ($\gamma_{\min}$ y $\gamma_{\max}$) a valores comparables con aquellos obtenidos usando tensioactivos que se obtienen de fuentes naturales.

La adición de SP-B o un análogo activo de la misma a la mezcla de péptido/lípido-fosfolípidos dio resultados particularmente favorables. Además se ha encontrado en forma sorprendente que las polimixinas, en particular la polimixina B,

actúa como sustituyente de la SP-B y su adición dio resultados comparables a aquellos alcanzados con SP-B.

De acuerdo a un segundo aspecto, la invención proporciona un tensioactivo sintético que comprende uno o más péptidos de la fórmula (I), en mezclas con lípidos y/o fosfolípidos y/o en forma opcional SP-B, un derivado activo de la misma, o polimixinas. Los lípidos/fosfolípidos apropiados se pueden seleccionar a partir del grupo formado por fosfatidilcolinas, (preferiblemente DPPC), PG, PA, triacilgliceroles, esfingomielina.

En una realización de la invención de aún mayor preferencia, se deben usar mezclas de tensioactivos que contienen el péptido en las cuales las cadenas palmitoilo están unidas en forma O-covalente a los residuos Ser. Se ha encontrado que las mezclas de tensioactivos que contienen una forma dipalmitoilada del péptido de referencia (SP-C(Leu)) exhiben una mayor estabilidad de la película de superficie y un mayor tamaño del reservorio lípido asociado a la superficie comparado con mezclas que contienen el correspondiente péptido no palmitoilado, medido por el sistema de burbuja cautiva. En las muestras que contienen 5% de péptido dipalmitoilado, el $\gamma_{\min}$ fue menor de 1,5 mN/m y las películas fueron muy estables cuando la tensión superficial aumentó una cantidad menor de 0,5 mN/m dentro de 10 minutos a volumen de burbuja constante. Por el contrario, el $\gamma_{\min}$ del péptido no palmitoilado fue de aproximadamente 5 mN/m y las películas fueron menos estables como se puede observar por el frecuente chasquido de las burbujas a bajas tensiones superficiales. Más aún, luego del agotamiento de la sub-fase para muestras que contienen péptido no palmitoilado, la capacidad de alcanzar una tensión superficial estable cercana a cero se perdió luego de unos pocos pasos de adsorción, mientras que con el péptido dipalmitoilado la calidad de la película no se deteriora incluso luego de más de 10 pasos de expansión y la incorporación de material de reserva equivalente a más de dos monocapas. La actividad superficial mejorada de los péptidos dipalmitoilados también fue demostrada por el tensiómetro de burbuja pulsante. Además, se encontró que la presencia de grupos acilo reduce en forma adicional la tendencia a formar oligómeros. Este hallazgo es muy importante, ya que durante la preparación de tensioactivos artificiales se ha encontrado que la oligomerización de péptidos impide la preparación de las mezclas a

concentraciones mayores de 20 mg/ml (Nilsson et al. Eur. J. Biochem. 1998, **255**, 116-124).

Los tensioactivos sintéticos se pueden preparar mezclando soluciones o suspensiones de péptidos y lípidos y a continuación secando la mezcla.

En el momento necesario, la mezcla seca puede ser suspendida, dispersada o administrada como tal a sujetos con necesidad de tratamiento por deficiencia de tensioactivo.

El tensioactivo sintético será administrado preferiblemente en forma endotraqueal o vía aerosol. La última forma de administración requerirá la combinación de pequeñas partículas de tensioactivo con un propelente inerte adecuado. Otras formas de administración, como la nebulización o rociado de soluciones/suspensiones estables de tensioactivo, también están incluidas dentro del alcance de la invención.

De acuerdo a otro aspecto, la invención proporciona el uso de los péptidos descritos para la preparación de un agente tensioactivo para usar en todos los casos de deficiencia o disfunción de tensioactivo en adultos o neonatal, enfermedades pulmonares relacionadas tales como la neumonía, bronquitis, asma, síndrome de aspiración de meconio y también otras enfermedades tales como la otitis media serosa (adhesiva).

Típicamente el tensioactivo será usado preferiblemente por administración endotraqueal, en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria el cual afecta de modo frecuente a los infantes prematuros.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en mayor detalle.

Ejemplo 1: Síntesis y purificación del péptido

Un análogo de la SP-C, la SP-C(LKS) (Fig.1), fue sintetizado usando la tecnología de fase sólida por pasos y la química del ter-butiloxycarbonilo (Kent, S.B.H. (1988) Annu. Rev. Biochem. **57**, 957-989) en un instrumento Applied Biosystems 430A. La ruptura de la unión resina-péptido y la desprotección de las cadenas laterales se llevaron a cabo en fluoruro de hidrógeno anhidro/metoxibenceno/dimetilsulfuro, 10:1:1 (v/v/v) por 1,5 h a 0 °C. Los grupos protectores y secuestrantes fueron removidos por extracción repetida con dietil éter y el péptido fue extraído de la resina en forma subsiguiente con diclorometano/ácido trifluoroacético (TFA) 3:1 (v/v) seguido por

evaporación rotativa. El extracto del péptido crudo se re-disolvió a una concentración de 100 mg/ml en cloroformo/metanol 1:1 (v/v) que contenía 5% de agua. Una alícuota de 10 mg se aplicó a una columna Sephadex LH-60 (40 x 1 cm) en el mismo solvente (Curstedt, T. et al. (1987) Eur.J. Biochem, **168**, 255-262). Se recolectaron fracciones de 2,5 ml y se midieron las absorbancias a 214 y 280 nm. La identificación y cuantificación se realizaron por análisis de aminoácidos.

Para la acilación, el péptido purificado (típicamente aproximadamente 5 mg) se seca y se disuelve en TFA destilado (100 μ l) y se agrega el cloruro de acilo (10 a 20 equivalentes en comparación al péptido). Luego de 10 minutos la reacción se apaga con etanol acuoso al 80% (1,9 ml). La purificación de los acil péptidos se realiza usando cromatografía sobre Lipidex 5000 en cloruro de etileno/metanol 1:4 (v/v) seguida por HPLC de fase invertida sobre una columna C18 usando un gradiente lineal de 2-propanol/0,1% TFA corriendo en metanol (acuoso) 60%/0,1% TFA o etanol (acuoso) 75%/0,1% TFA.

Ejemplo 2: Caracterización Bioquímica

La pureza del péptido se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) dodecil sulfato de sodio (SDS) (Phast-system, Pharmacia, Suecia) y por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usando una columna C18 y un gradiente lineal de metanol (acuoso) 60% / 0,1% TFA e isopropanol / 0,1% TFA (Gustafsson, M. et al. (1997) Biochem. J. **326**, 799-806).

Las masas moleculares se determinaron por espectrometría de masa por desorción ionización láser asistido por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Lasermat 2000, Finnigan MAT) calibrado con péptido vasoactivo intestinal (M_r 3326,8).

La estructura secundaria del péptido se investigó usando espectroscopía por dicroísmo circular (CD) (Jasco-720 Jasco, Japan). Luego de la solubilización con trifluoroetanol (TFE) se registraron los espectros de 260 a 184 nm con una velocidad de barrido de 20 nm/min y una resolución de 2 puntos por nm. Se calculó la elipticidad molar residual y se expresó en kdeg x cm^2/dmol . Las elipticidades molares a 208 y 222 nm se utilizaron para estimar el contenido de estructura helicoidal (Barrow, C.J. et al. (1992) J. Mol. Biol. **225**, 1075-1093).

Las investigaciones sobre la estructura secundaria de la SP-C(LKS) usando espectroscopía CD mostraron un espectro típico de péptidos α -helicoidales y se estimó un contenido de hélices α de aproximadamente 75% a partir de los mínimos a 208 y 222 nm. la estructura secundaria permaneció estable luego de la dilución a pasos con agua hasta un 12% TFE con la condición de que el péptido fuera solubilizado en TFE.

El SDS-PAGE de la SP-C(LKS) mostró una banda única similar a la de la SP-C nativa, mientras que la SP-C(Leu), la cual no tiene Lys en la parte helicoidal, forma oligómeros. En contraste a nuestra experiencia con mezclas SP-C(Leu)/lípidos, las cuales son difíciles de solubilizar en concentraciones mayores de 20 mg/ml (Nilsson, G. et al. (1998) Eur. J. Biochem. **255**, 116-124), se pudo realizar una mezcla SP-C(LKS)/lípidos con una concentración de lípidos de 80 mg/ml y una relación polipéptido/lípidos de 0,03.

Ejemplo 3: Preparación de mezclas péptido/lípidos

El DPPC, PG y PA fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Los lípidos, disueltos en cloroformo/metanol 98:2 (v/v), se mezclaron en las proporciones DPPC:PG:PA de 68:22:9 (p/p/p) o DPPC:PG de 7:3 (p/p). Las preparaciones de los tensioactivos se realizaron agregando SP-C(LKS) solo o SP-C(LKS) y SP-B a cada una de las mezclas de lípidos, a una relación en peso de péptido total/lípidos de 0 - 0,05. Las mezclas se evaporaron bajo nitrógeno y fueron suspendidas nuevamente en NaCl 150 mmol/l o en 10 mmol/l de regulador de pH Hepes de pH 6,9 que contiene 140 mmol/l de NaCl y 2,0 mmol/l de CaCl_2 , a una concentración de lípidos de 10-80 mg/ml. Se realizaron congelamientos y sonicaciones repetidas veces (50 W, 48 kHz) hasta alcanzar suspensiones homogéneas. En algunos casos las suspensiones finales se incubaron a 45 °C por 1 hora.

Las preparaciones de tensioactivos suspendidas en NaCl 150 mmol/l tienen un pH de 3,5 - 5,5. Los menores valores de pH, 3,5 a 4,5, se observaron en las preparaciones que contienen SP-B. Como el SP-B nativo se purifica usando solventes orgánicos acidificados (Curstedt, T. et al. (1987) Eur. J. Biochem, **168**, 255-262), en las preparaciones pueden permanecer pequeñas cantidades de ácido. Se obtuvo un pH cercano al fisiológico suspendiendo la preparación tensioactiva en regulador de pH Hepes de pH 6,9, que contiene 140 mmol/l de NaCl y 2 mmol/l de CaCl_2 (Tabla 1).

Comparando con las preparaciones correspondientes en solución salina no regulada no hubo cambios en γ_{min} o γ_{max} cuando se usó DPPC/PG 7:3 (p/p) como mezcla de lípidos. Sin embargo, cuando se incluyó el PA en la mezcla de lípidos, ambos, γ_{min} y γ_{max} aumentaron en el mayor pH (Tablas 1 y 2).

TABLA 1: Propiedades de superficie de las preparaciones de tensioactivo artificial en solución fisiológica salina.

La mediciones se llevaron a cabo directamente luego de la preparación de las muestras o luego de la incubación por 1 hora a 45 °C. La concentración de los fosfolípidos fue de 10 mg/ml en NaCl 150 mmol/l. Los registros se obtuvieron a diferentes periodos de tiempo con un tensiómetro de burbuja pulsante a 37 °C, 50% de compresión de superficie y a una velocidad de 40 ciclos por minuto. Los valores son los medios (desviación estándar) de 3-5 mediciones. Las abreviaturas están definidas en el texto.

Preparación del tensioactivo			Tensión superficial (mN/m)						
SP-C (LKS) (% p/p)	SP-B (% p/p)	Fosfolípidos	Temperatura de incubación	7,5 seg.		1 min.		5 min.	
				$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$
3	-	DPPC/PG/P A	-	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(0)
3	-	DPPC/PG/P A	45 °C	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(1)
3	2	DPPC/PG/P A	-	<1	33(2)	<1	33(2)	<1	33(2)
3	2	DPPC/PG/P A	45 °C	<1	34(2)	<1	34(2)	<1	25(2)
3	-	DPPC/PG	-	12	39(5)	14(4)	42(4)	9(5)	42(2)
3	-	DPPC/PG	45 °C	8(3)	35(5)	9(3)	39(5)	6(4)	42(3)
3	2	DPPC/PG	-	2(1)	31(1)	2(1)	31(3)	2(1)	33(1)
3	2	DPPC/PG	45 °C	3(3)	29(3)	1(1)	33(2)	1(0)	36(1)
3	1	DPPC/PG	-	<1	24(4)	1(2)	26(4)	<1	31(1)
3	0,5	DPPC/PG	45 °C	4(2)	29(1)	4(3)	29(2)	3(1)	34(2)

TABLA 2: Propiedades superficiales de las preparaciones de tensioactivo artificial en solución salina a pH regulado.

La mediciones se llevaron a cabo sobre muestras que contienen fosfolípidos a una concentración de 10 mg/ml en regulador de pH Hepes (pH 6,9) que contiene 140 mmol/l de NaCl y 2,0 mmol/l de CaCl₂. Los registros se obtuvieron a diferentes periodos de tiempo con un tensiómetro de burbuja pulsante a 37 °C, 50% de compresión de superficie y a una velocidad de 40 ciclos por minuto. Los valores son los medios (desviación estándar) de 3-5 mediciones. Las abreviaturas están definidas en el texto.

Preparación del tensioactivo			Tensión superficial (mN/m)					
SP-C (LKS) (% p/p)	SP-B (% p/p)	Fosfolípidos	7,5 seg. $\gamma_{min} - \gamma_{max}$		1 min. $\gamma_{min} - \gamma_{max}$		5 min. $\gamma_{min} - \gamma_{max}$	
3	-	DPPC/PG/PA	4(1)	44(2)	5(2)	47(2)	7(2)	50(1)
3	2	DPPC/PG/PA	3(3)	38(3)	4(4)	40(2)	3(3)	44(2)
3	2	DPPC/PG	15(3)	39(4)	16(2)	42(3)	13(3)	44(3)
3	2	DPPC/PG	2(2)	26(3)	1(1)	29(3)	<1	35(1)

Ejemplo 4: Preparación de mezclas de fosfolípidos con SP-C(LKS) y polimixina B.

El DPPC y el PG se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Los fosfolípidos, disueltos en cloroformo/metanol 98:2 (v/v), se mezclaron en proporciones DPPC/PG 7:3 (p/p). La SP-C(LKS) se agregó a las mezclas de fosfolípido a una relación en peso de péptido total/fosfolípido de 0,03. Las mezclas se evaporaron bajo nitrógeno y se suspendieron nuevamente a temperatura ambiente en regulador de pH Hepes de pH 6,9 de 10 mmol/l que contiene 140 mmol/l de NaCl y 2,0 mmol/l de CaCl₂ o en el mismo regulador que contiene 0,01 % de polimixina B (PxB) de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Se realizaron congelamientos y sonicaciones repetidas veces (50 W, 48 kHz) hasta alcanzar suspensiones homogéneas. La concentración final de fosfolípido para ambas preparaciones fue de 10 mg/ml. La adición de PxB disminuyó tanto γ_{min} como γ_{max} y se obtuvo una óptima actividad superficial (Tabla 3).

TABLA 3: Propiedades superficiales de un tensioactivo artificial con y sin la adición de polimixina B.

Los registros se obtuvieron a diferentes periodos de tiempo con un tensiómetro de burbuja pulsante a 37 °C y 50% de compresión de superficie y a una velocidad de 40 ciclos por minuto. Los valores son los medios (desviación estándar) de 5 a 11 mediciones. Las abreviaturas están definidas en el texto.

Preparación del tensioactivo		Tensión superficial (mN/m)					
------------------------------	--	----------------------------	--	--	--	--	--

SP-C (LKS) (% p/p)	PxB (% p/p)	Fosfolípidos	7,5 seg.		1 min.		5 min.	
			$\gamma_{min} - \gamma_{max}$		$\gamma_{min} - \gamma_{max}$		$\gamma_{min} - \gamma_{max}$	
3	-	DPPC/PG	15(3)	39(4)	16(2)	42(3)	13(3)	44(3)
3	1	DPPC/PG	3(2)	29(3)	2(2)	31(4)	1(1)	34(2)

Ejemplo 5: Caracterización biofísica

La cinética de dispersión sobre la superficie se midió a aproximadamente 34 - 37 °C con una balanza de Wilhelmy (Biegler, Viena, Austria). La tensión superficial se midió durante 10 minutos usando una placa de platino conectada a una celda de tensión e insertada 1 mm en una hipofase de 20 ml de NaCl de 150 mmol/l en un canal de Teflón. Las suspensiones se agregaron de a gotas, totalizando 1 mg de lípidos, sobre la hipofase, a 4 cm de la placa de platino.

Las mediciones cinéticas de SP-C(LKS) al 3 % en peso en DPPC/PG 7:3 (p/p) usando la balanza de Wilhelmy mostraron una rápida dispersión con una tensión superficial de 28 mN/m luego de 3 segundos (Fig. 2). La dispersión fue de alguna manera más lenta usando SP-C(LKS) al 1 % en peso en la misma mezcla de lípidos (los datos no se muestran). La adición de SP-B al 2 % en peso no cambia en forma significativa la velocidad de dispersión o la tensión superficial de equilibrio (Fig. 2). No se observaron mejoras luego de la incubación de la mezcla por 1 h. a 45 °C (los datos no se muestran). Se obtuvieron resultados similares con DPPC:PG:PA, 68:22:9 (p/p/p) como mezcla de lípidos (los datos no se muestran).

La tensión superficial dinámica se registró usando un tensiómetro de burbuja pulsante (Surfactometer International, Toronto, Canadá) a 37 °C durante una compresión cíclica del 50% de la superficie de la burbuja a una frecuencia de 40 ciclos por minuto. Todas las mediciones se realizaron por 5 minutos y a una concentración de lípido de 10 mg/ml. Los gradientes de presión a través de la pared de la burbuja se midieron a intervalos de tiempo específicos y se usaron para calcular la tensión superficial al mínimo (γ_{min}) y al máximo (γ_{max}) tamaño de burbuja.

En el tensiómetro de burbuja pulsante, un 3 % en peso de SP-C(LKS) en DPPC:PG:PA, 68:22:9 (p/p/p) produjo una tensión superficial menor de 1 mN/m al mínimo radio de burbuja (γ_{min}) mientras que se observó un γ_{min} de 9 - 14 mN/m con un 3 % en peso de SP-C(LKS) en DPPC:PG, 7:3 (p/p) (Tabla 1). La tensión superficial al máximo radio de burbuja (γ_{max}) fue de aproximadamente 40 mN/m en ambos casos. La

adición de un 2 % en peso de SP-B dió valores de γ_{max} de 31 a 33 mN/m y γ_{min} de 0 - 2 mN/m para ambas preparaciones de lípido. Estos valores son muy similares a aquéllos obtenidos con preparaciones de tensioactivo aisladas de fuentes naturales (Robertson, B. et al. (1990) Prog. Respir. Res. **25**, 237-246). La incubación de las preparaciones a 45 °C por 1 hora no tuvo un efecto significativo sobre la actividad superficial (Tabla 1). Disminuyendo la cantidad de SP-B al 0,5 % en peso en la mezcla de 3 % en peso de SP-C(LKS) en DPPC:PG, 7:3 (p/p) se tiende a aumentar el γ_{min} aunque los resultados no alcanzan una significación estadística (Tabla 1). En contraste al SP-B, la adición de 2 % en peso de KL₄ (Cochrane, C.G. and Revak, S.D. (1991) Science 254, 566-568) en la mezcla de 3 % en peso de SP-C(LKS) en DPPC:PG:PA,68:22:9 (p/p/p) no redujo el γ_{max} que permaneció relativamente alto en 41-42 mN/m.

Ejemplo 6: Comparación entre mezclas que contienen péptidos de referencia dipalmitoilados y no palmitoilados.

Las preparaciones de tensioactivo se hicieron por adición de un 3 % en peso de SP-C(Leu) o SPC(Leu) dipalmitoilada a cada mezcla de lípidos hechas de DPPC:PG:PA, 68:22:9 (p/p/p). Las mezclas se evaporaron bajo nitrógeno y fueron suspendidas nuevamente en NaCl 150 mmol/l a una concentración de lípidos de 10 mg/ml. En las muestras en las cuales también se usó un sustituyente de la SP-B, se agregó un 1 % en peso de polimixina B.

Las mezclas que contienen SP-C(Leu) dipalmitoilado, con o sin polimixina B, exhiben una mejora significativa especialmente en la reducción del γ_{max} a 5 min. y del γ_{min} a intervalos de tiempo más tempranos.

TABLA 4: Propiedades superficiales

La tensión superficial de las muestras se obtuvo con un tensiómetro de burbuja pulsante. Luego de dos minutos de alcanzar el equilibrio, se obtuvieron los registros a diferentes periodos, a 37 °C y 50% de compresión de superficie y a una velocidad de 40 ciclos por minuto.

Preparación del tensioactivo			Tensión superficial (mN/m)					
SP-C(Leu) (% p/p)	SP-C(Leu) dipalmitoil. (% p/p)	PxB (% p/p)	7,5 seg.		1 min.		5 min.	
			$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$
1			11	39	6,2	39	2	42
1		1	3	37	3	38	0	40

	1		1	34	1	35	1	36
	1	1	0	29	0	34	0	35

Ejemplo 7: Determinación *in vivo*

El efecto de la terapia con tensioactivos sobre las propiedades mecánicas de los pulmones inmaduros se evaluó en 9 conejos nacidos antes de término con una edad gestacional de 27 días. A los animales se les realizó una traqueotomía al nacer y cinco de ellos recibieron, vía la cánula traqueal, dos veces 2,5 ml/kg de tensioactivo artificial que contenía DPPC, PG, y SP-C (LKS), con o sin poliximina B, en las proporciones indicadas arriba. La concentración total de fosfolípido del material tensioactivo exógeno fue de 40 mg/ml. Dos animales sirvieron como control negativo no recibiendo ningún material vía tubo traqueal, y otros dos sirvieron como control positivo siendo tratados con la misma dosis del tensioactivo natural modificado (Curosurf, Chiesi Farmaceutici Spa, Parma, Italia) diluido a 40 mg/ml. Un animal fue tratado con una mezcla de DPCC y PG en salina (la misma concentración anterior) a una dosis de 2,5 ml/kg. Todos los animales se mantuvieron en cajas de pletismógrafo corporal a una temperatura de 37 °C y ventilados en paralelo por 60 minutos con oxígeno 100%, usando un Servo Ventilador 900B (Siemens-Elema, Solna, Suecia) puesto a una frecuencia de 40 min. y 50% de tiempo de inspiración. Los volúmenes periódicos se midieron con un neumotacógrafo conectado a cada caja de pletismógrafo. Los animales fueron ventilados con un volumen de ventilación pulmonar estándar de 8-10 ml/kg y sin presión de fin de expiración positiva (PEEP). La concordancia pulmón-torax se definió como la relación entre el volumen de ventilación pulmonar y el pico de presión de inspiración , y se expresó como ml/cm H₂O. kg.

En comparación con los animales de control no tratados, la concordancia pulmón-torax mejoró en forma significativa en los animales tratados con el tensioactivo artificial, especialmente en el animal que recibía el tensioactivo que contiene polimixina B. Notablemente, la mejora parece ser superior a la vista luego del tratamiento con una dosis similar de tensioactivo natural modificado (Fig. 3).

Breve descripción de las figuras.

Fig. 1: Secuencias de aminoácidos y presentaciones de la rueda helicoidal de la SP-C y sus análogos.

La secuencia de SP-C humana está tomada de Johansson, J. et al. (1988) FEBS Lett. **232**, 61-64 y la de la SP-C(Leu) de Nilsson, G. et al. (1998) Eur. J. Biochem. **255**, 116-124. La SP-C(LKS) está basada en la estructura primaria del SP-C pero todos los residuos Val en las posiciones 16-28 con la excepción de la posición 17 están reemplazados por residuos Leu, los residuos Lis han sido introducidos en las posiciones 17, 22 y 27, y la Cis palmitoilada en las posiciones 5 y 6 está reemplazada con Ser.

Fig. 2 Dispersión en la superficie de las preparaciones de tensioactivos sintéticos.

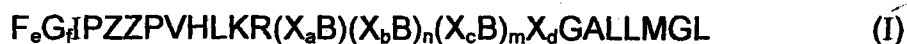
Cinética de dispersión de la SP-C(LKS) al 3 % en peso (cuadrados llenos, línea continua) y de la SP-C(LKS) al 3 % en peso con la adición de un 2 % en peso de SP-B (triángulos abiertos, línea punteada). Todas las preparaciones fueron examinadas a una concentración de 10 mg/ml de DPPC:PG, 7:3 (p/p) en NaCl 150 mmol/l. Los registros se obtuvieron con una balanza Wilhelmy y cada punto es la media de tres diferentes registros.

Fig. 3 Resultados *in vivo*.

Concordancia pulmón-torax en 5 conejos nacidos antes de término con una edad gestacional de 27 días ventilados con un volumen de ventilación pulmonar estándar de 8 - 10 ml/kg y sin presión de fin de expiración positiva (PEEP). La concordancia pulmón-torax es mejorada en forma significativa en los animales tratados. La adición de polimixina B (PxB) parece aumentar el efecto del tensioactivo artificial. La concentración de fosfolípidos es la misma en todas las preparaciones de tensioactivos, es decir 40 mg/ml.

REIVINDICACIONES::

1. Análogos de SP-C CARACTERIZADOS PORQUE que tienen la fórmula general (I), de acuerdo al código de aminoácidos de una letra:



donde:

X es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por V, I, L, Nle (norleucina);

B es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por ornitina, K, I, W, F, Y, Q, N;

Z es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por S, C, F donde los residuos Ser o Cys, en forma opcional, están unidos vía uniones éster o tioéster con grupos acilo que contienen de 12 a 22 átomos de carbono,

a es un entero de 1 a 19

b es un entero de 1 a 19

c es un entero de 1 a 21

d es un entero de 0 a 20

e es 0 o 1

f es 0 o 1

n es 0 o 1

m es 0 o 1

con las condiciones siguientes:

$n + m > 0$,

$f \geq e$

$(X_a B) (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$ es una secuencia que tiene un total de 22 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 22 aminoácidos.

2. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADOS PORQUE tienen la fórmula (Ia):



3. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADOS PORQUE tienen la fórmula (Ib):



4. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADOS PORQUE tienen la fórmula (Ic):

(Ic) FGIPSSPVHLKRX₄BX₁₁GALLMGL

5. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADOS PORQUE tienen la fórmula (Id):

(Id) FGIPSSPVHLKRX₆BX₇GALLMGL

6. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1 CARACTERIZADOS PORQUE tienen la fórmula (Ie):

(Ie) FGIPSSPVHLKRX₁₁BX₄GALLMGL

7. Análogos de SP-C de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6 CARACTERIZADOS PORQUE los residuos Ser están acilados preferiblemente con grupos palmitoílo.

8. Análogos de SP-C de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 7 CARACTERIZADOS PORQUE B es Lisina o Fenilalanina y X es Leucina, Isoleucina o Norleucina.

9. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 8 CARACTERIZADOS PORQUE están seleccionado a partir del grupo formado por:

SP-C (LKS)	FGIPSSPVHLKRLIL <u>K</u> LLLLKILLKLGALLMGL
SP-C (LKS) ₁	FGIPSSPVHLKRLILLLKLLLLIKLLILGALLMGL
SP-C (LKS) ₂	FGIPSSPVHLKRLILKLLLLLILLILGALLMGL
SP-C (LKS) ₃	FGIPSSPVHLKRLILLLLLLKLILLILGALLMGL
SP-C (LKS) ₄	FGIPSSPVHLKRLILLLLLLLIKLLILGALLMGL
SP-C (LFS)	FGIPSSPVHLKRLILFLLLLFILLFLGALLMGL

10. Un tensioactivo sintético CARACTERIZADO PORQUE comprende por lo menos un análogo de SP-C de la fórmula (I) en una mezcla con lípidos y fosfolípidos.

11. Un tensioactivo sintético de acuerdo a la reivindicación 9 CARACTERIZADO PORQUE la mezcla de lípidos/fosfolípidos comprende DPPG, PG, PA.

12. Un tensioactivo sintético de acuerdo a las reivindicaciones 10 - 11 CARACTERIZADO PORQUE además comprende SP-B o un derivado activo del mismo o una polimixina.

13. Un tensioactivo sintético de acuerdo a las reivindicaciones 10 - 12 CARACTERIZADO PORQUE está en forma de solución, dispersión, suspensión, o polvo seco.

14. El uso de análogos de SP-C de las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de un tensioactivo sintético para ser usado en todos los casos de deficiencia de tensioactivo.
15. El uso de polimixina, preferiblemente la polimixina B para la preparación de un tensioactivo artificial de acuerdo a las reivindicaciones 10 - 13, para el tratamiento de todos los casos de deficiencia o disfunción de tensioactivo, enfermedades pulmonares relacionadas tales como neumonía, bronquitis, asma, síndrome de aspiración de meconio y también otras enfermedades tales como la otitis media serosa (adhesiva).
16. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 14 y 15 CARACTERIZADO PORQUE la deficiencia del tensioactivo es el síndrome de dificultad respiratoria.

**PÉPTIDOS ARTIFICIALES QUE TIENEN ACTIVIDAD SUPERFICIAL Y EL USO DE
LOS MISMOS EN LA PREPARACIÓN DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL**

RESUMEN

Se describen péptidos artificiales análogos de la SP-C que tienen actividad superficial, y su uso para la preparación de tensioactivos artificiales útiles en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (RDS) y otras enfermedades relacionadas a deficiencia o disfunción de tensioactivo.

271

1/3

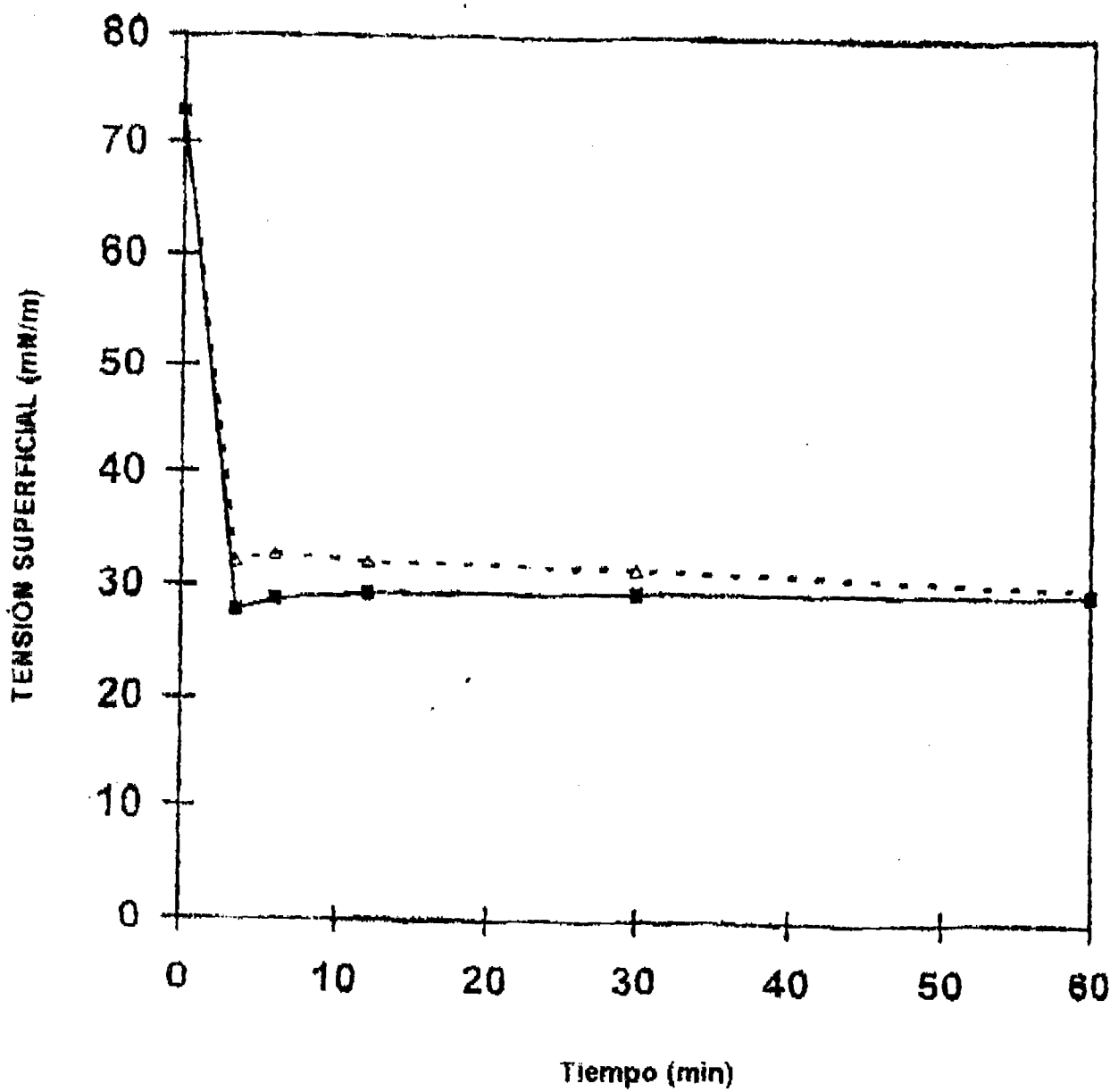
FIGURA 1

SP-C Human
SP-Q(LKS)
SP-Q(Lcu)

25

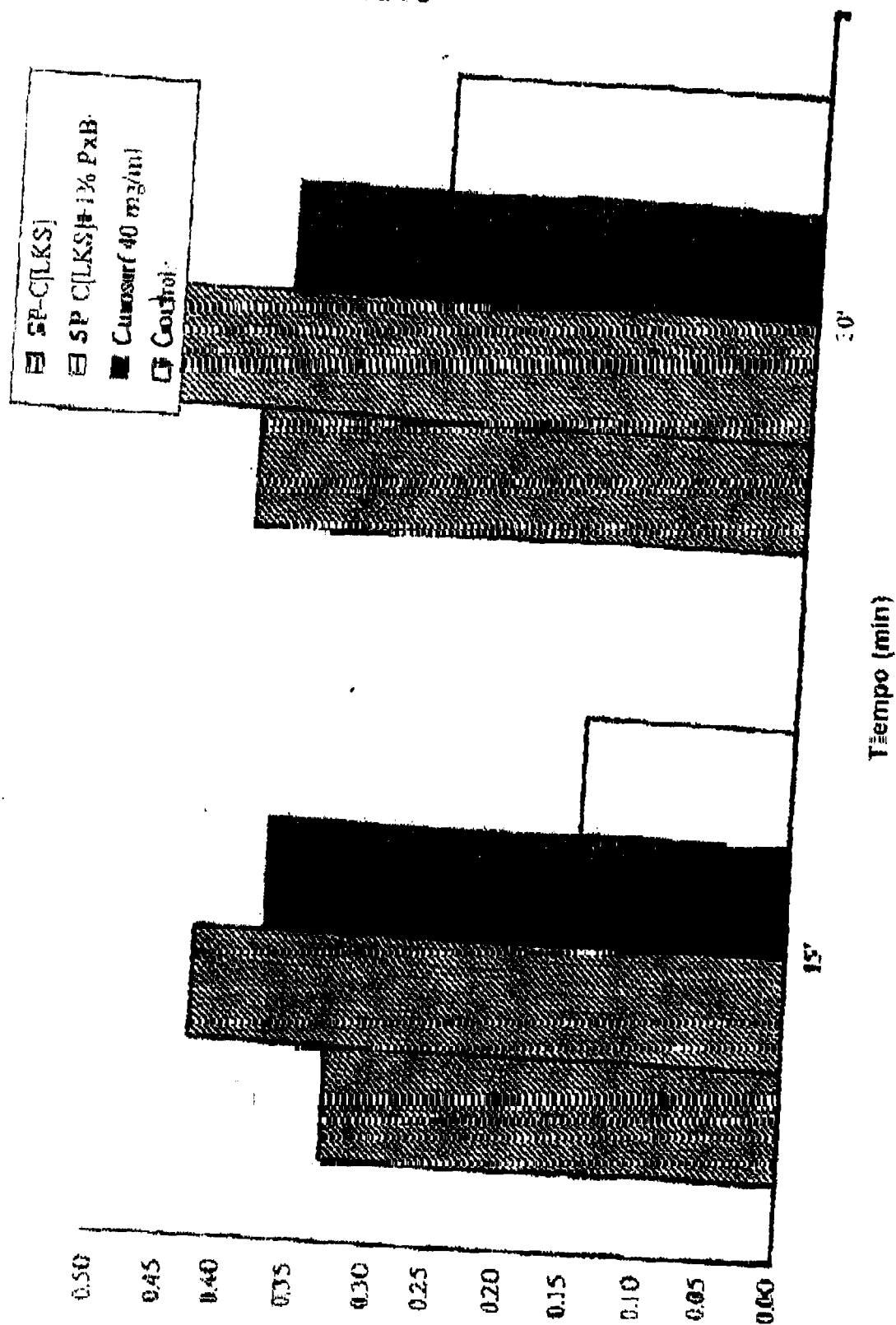
2/3

FIGURA 2



3/3

FIGURA 3



REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN/TRÁMITE

Patente de Invención

☒

Modelo de Utilidad

☐

- ☒ Nombre e identificación del solicitante
- ☒ Nombre e identificación del inventor
- ☒ Título o nombre de la invención
- ☒ Descripción
- ☒ Relvindicaciones
- ☒ Resumen
- ☒ Comprobante de pago

☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐

COMPLETA

INCOMPLETA

Diseño Industrial

☐

- ☐ Nombre e identificación del solicitante
- ☐ Nombre e identificación del inventor o diseñador
- ☐ Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- ☐ Representación gráfica
- ☐ Comprobante de pago

COMPLETA

INCOMPLETA


FIRMA RESPONSABLE.

Fecha _____

29 29

Folio 32

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Primer EXAMEN DE FORMA

2000-04-
430

Radicación no 00009307

Concepto Técnico no SBS Clasificación Internacional de Patentes A61K 39/16, C07K 14/00

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☒ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 13 de abril /00

202016

EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

29
2000-02-14
430

EXPEDIENTE 00-09307

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒ NO ☐ **NO APLICABLE** ☐ Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y el Decreto 298 del 17 de febrero de 1999).

SI ☒ NO ☐ **EXTEMPORANEAMENTE** ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI ☐ NO ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

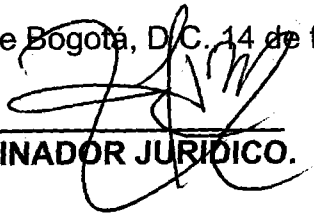
OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C. 14 de febrero del 2000.


EXAMINADOR JURIDICO.

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-09307

AUTO 381

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor XXXXXXXXX como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

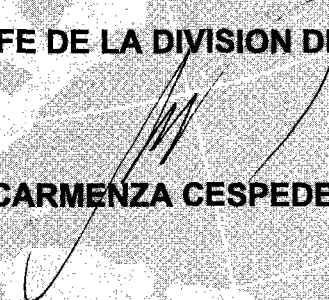
ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 25 ABR 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 27 ABR 2000  notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ☐ NO ☐

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA