

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

OL
Pbf

INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-11561

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA
QUINASA C E INDUCTOR DE APOPTOSIS

71. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K¹⁶/44, 9/00

71. SOLICITANTE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DOMICILIO

Carrera 45 No 26-85 BOGOTÁ D.C.

74. APODERADO

JULIO CÉSAR RAMÍREZ

22. BOGOTÁ, D. C.,

FEBRERO DE 2009

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-011561-00000-0000

Fecha: 2009-02-06 16:37:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 18

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **Universidad Nacional de Colombia**

Dirección: Carrera 45 No. 26 – 85

Teléfono: 3165000 Fax:

E-Mail: webmaster@unal.edu.co

Domicilio: BOGOTÁ D.C.

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☒

C.E. ☐ Otro ☐

Número **899.999.063 - 3**

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **JULIO CÉSAR RAMÍREZ PIÑA**

Dirección: Carrera 11 No. 86 – 32 Oficina 101

Teléfono: 7420191 Fax: 5300958

E-Mail: julioramirez@estrategiajuridica.net

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número **79.779.990**
TP **113206**

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: **JEAN PAUL VERNOT HERNANDEZ**

Dirección: Carrera 11 No. 86 – 32 Oficina 101

Teléfono: 7420191 Fax: 5300958

E-Mail:

Domicilio: BOGOTÁ D.C.

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número **79.146.396**

Título(54):
PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA C E INDUCTOR DE APOPTOSIS

Clasificación Internacional (51): C07K 16/44, C07K 9/00

Prioridad

SI ☐ NO ☐

(33)País de Origen

(32)Fecha

(31)N° de Solicitud

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☒ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐

Comprobante de Pago No.:

Fecha

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de reivindicación de prioridad.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Descripción de la invención.
- ☐ Una o más reivindicaciones.
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de la comunidad de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12 y 6x6 cm.
- ☐ Resumen y extracto para publicación.

NOMBRE: JULIO CÉSAR RAMÍREZ PIÑA

FIRMA: 7001
C.C. 79.779.990 TP. 113.206

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA C E INDUCTOR DE
APOPTOSIS

PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA C E INDUCTOR DE APOPTOSIS

DESCRIPCIÓN

El péptido sintético HKPS de la presente invención esta formado por 24 aminoácidos: AAVALLPAVLLALLAPRKGALRQY. La existencia de este péptido sintético no ha sido reportada en la literatura. Los inhibidores de PKC comúnmente investigados son altamente efectivos en inhibir la función de PKC pero son relativamente inespecíficos, algunos de estos pueden inhibir otras familias de quinasas. Los pseudosustratos de la PKC son dominios autoinhibitorios los cuales pueden ser utilizados para inhibir mas específicamente la PKC *in vitro* pero ellos no pueden penetrar libremente a las células. Esto pudo resolverse utilizando pseudosustratos de PKC permeables a la célula que modulan mas específicamente la actividad de la PKC intracelularmente. Por ello, se desarrolló un péptido quimérico inhibitorio de las isoformas clásicas de la PKC, que consistió en una secuencia permeable a la célula y una secuencia pseudosustrato. Este péptido fue capaz de translocarse dentro de las células, inhibir la actividad quinasa de la PKC y la fosforilación del sustrato específico de PKC en células T, así como disminuir la respuesta proliferativa de células T y en una línea celular T ante la estimulación con mitógenos. A altas concentraciones, el péptido causó pérdida de viabilidad en estas células. Además produjo muerte celular en las formas intracelulares de trofozoito de Plasmodium falciparum e inhibió drásticamente la invasión de la forma infectante de merozoito de Plasmodium falciparum.

La selección del péptido permeable denominado en este trabajo HK se basó en su utilización en trabajos previos específicamente en células del sistema inmunitario que mostraron el uso efectivo del mismo (Liu X y col., 2000; Torgerson TR y col., 1998). En particular, se encontró que el dominio correspondiente a la región hidrofóbica del péptido señal del factor de crecimiento de los fibroblastos que se expresa en el sarcoma de Kaposi (Lin y col., 1995) ha sido utilizado mayoritariamente en estudios relacionados con células del sistema inmunitario (macrófagos y linfocitos T) mostrando efectividad en la internalización, modulación de señales intracelulares particulares. Esta secuencia, además, ha sido utilizada en otros tipos celulares, como fibroblastos, inhibiendo efectivamente señales específicas al interior celular (Rojas y col., 1996; Nekhai y col., 2000). Esta secuencia está constituida por 14 aminoácidos hidrofóbicos y dos prolinas AAVALLPAVLLALLP y muestra por estudios conformacionales que forma una estructura en hélice alfa (Du y col., 1998). Por esa característica la interacción directa con la membrana ha sido el mecanismo propuesto para su internalización.

La selección de la secuencia de pseudosustrato de PKC denominada PS se realizó a partir de alineamientos previos de las secuencias pseudosustrato de las diferentes isoformas de PKC (Pears y col., 1991; Oancea y col., 1998; Nishikawa y col., 1997; Eickholtz y col., 1993). Se escogió la secuencia RKGALRQ que ha sido identificada en los pseudosustratos de las isoformas clásicas α , β I, β II y γ . A esta secuencia se le adicionó una tirosina en su extremo carboxiterminal para su marcación con ^{125}I y uso en los ensayos de internalización por detección de marca radioactiva.

El péptido quimérico de 24 aminoácidos AAVALLPAVLLALLAPRKGALRQY resultó de la unión del péptido permeable (HK) en el extremo aminoterminal y el pseudosustrato (PS) en el extremo carboxiterminal incluyendo la tirosina adicionada al pseudosustrato.

Los siguientes métodos y ensayos biológicos *in vitro* son provistos en orden para que la presente invención pueda ser completamente entendida. Debe entenderse

que estos métodos y ejemplos son solamente con propósitos ilustrativos y no pueden ser interpretados como limitantes de la presente invención.

Métodos

Síntesis de péptidos

Los péptidos seleccionados se sintetizaron químicamente utilizando la técnica de síntesis múltiple en fase sólida (t-boc) como ha sido descrito previamente (Houghten, 1985). La secuencia del péptido permeable llamado aquí HK correspondió a la secuencia AAVALLPAVLLALLAP; el pseudosustrato de PKC α/β , llamado aquí PS, tiene la secuencia RKGALRQY, y el péptido quimérico HKPS resulta del acoplamiento de HK y PS con la secuencia AAVALLPAVLLALLAPRKGALRQY. Los péptidos se purificaron por HPLC y se caracterizaron por espectrofotometría de masas MALDI-TOF. Los péptidos utilizados tenían una pureza $\geq 90\%$, correspondiendo el peso teórico con el obtenido: HK, HKPS y PS: 1516, 2498 y 991 Da respectivamente.

Marcación de péptidos

Los péptidos se marcaron con FITC o con ^{125}I para verificar su internalización celular. El marcaje de los péptidos con FITC se realizó según protocolo descrito (Walter y col., 1998). Brevemente, 50 μl de solución de FITC (1 mg/ml) se agregó a cada péptido disuelto en buffer de carbonato de sodio 0.5 M pH 9 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. FITC no unido se removió por diálisis utilizando una membrana con poro de exclusión de 1 kDa (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). Los péptidos se resuspendieron en PBS para los diferentes ensayos. El radiomarcaje de los péptidos se realizó según protocolo descrito (Lin y col., 1995). Brevemente, 2 nM de péptidos purificados se marcaron con 4 ml de Na^{125}I (100 mCi/ml, ICN) y 0.3 μM de cloramina T por 15 minutos, la reacción se detuvo con 0.3 μM de bisulfito de sodio. Los péptidos radiomarcados se purificaron con una columna de Sephadex G-10. La concentración final de péptido se cuantificó por el kit de ácido bisinconínico (Pierce, Rockford, IL, USA) y la cantidad de péptido radiomarcado fue corregida para cada experimento de internalización.

Internalización celular de péptidos marcados con FITC y ^{125}I

5×10^4 células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por pozo se incubaron en medio RPMI completo, por triplicado, con los péptidos marcados con FITC a 40, 20, 10 y 5 μM . Después de 1 hora de incubación a 37°C en atmósfera humidificada, las CMSP se lavaron cuatro veces con PBS frío. La fluorescencia de FITC se detectó por citometría de flujo en un citómetro FACScan (BD Biosciences, San José, CA, USA) y se utilizó el software CellQuest (BD Biosciences, San José, CA, USA) para el análisis.

Un total de 1×10^6 CMSP humanas por pozo se incubaron por duplicado en cajas de 24 pozos en medio completo con los péptidos HKPS y PS radiomarcados con ^{125}I a 40 μM por 1 hora a 37°C en condiciones de atmósfera humidificada. Las células se lavaron con PBS varias veces hasta no detectar ninguna marca radioactiva. Las células se resuspendieron para la medición de radioactividad intracelular en un contador gamma (2/100 plus, ICN). La actividad específica del péptido fue 8.89×10^4 c.p.m./ μg y 1.73×10^4 c.p.m./ μg para PS y HKPS, respectivamente.

Medición de la actividad de la PKC

2.5 $\mu\text{g/ml}$ de PKC purificada de cerebro de rata a (Promega, Madison, WI, USA) se incubó con los péptidos HK, HKPS y PS a 2 μM en un buffer con 1 $\mu\text{g/ml}$ BSA y

0.05% Triton X-100 por 10 minutos a 4°C, y el ensayo de quinasas se realizó utilizando el sistema de ensayo de PKC Signatect (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En las muestras de la membrana se determinó la incorporación del sustrato ^{33}P neurogranina por un contador beta (β -scintillation system Beckman LS 6500, Beckman Instruments, Fullertown, CA, USA).

Western Blot de Lck

CMSP humanas se incubaron o no con el péptido HKPS a 5, 10 y 20 μM a 37°C y 5% CO_2 por 1 hora. Seguido del tratamiento con el péptido, las células se trataron o no con PMA a 50 ng/ml por 30 minutos. Pasada la incubación, se realizaron lavados con PBS y después se lisaron con 100 μl de un buffer con 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina A, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 1 mM ortovanadato de sodio y 10 mM de fluoruro de sodio. Los núcleos se centrifugaron a 400 x g y 4°C por 10 minutos. Los sobrenadantes se separaron por electroforesis denaturante de proteínas en geles de poliacrilamida (Cleveland y col., 1977) y electro-transferidos a membranas de nitrocelulosa (Biorad, Hercules, CA, USA) para western blot. Geles transferidos y no transferidos se tiñeron con azul de Coomassie y las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con rojo Ponceau para confirmar la transferencia de proteínas. Después del bloqueo con el buffer 5% leche descremada en PBS, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 125 mM NaCl; 0.1% Tween 20 (TBS-T) por 1 hora a 37°C, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C, con un anticuerpo de conejo policlonal anti-Lck diluido 1:200 en 5% leche descremada en TBS-T. Las membranas se lavaron e incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con anti-conejo IgG conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1:4000 (Sigma, St Louis, MO, USA) en 5% leche descremada en TBS-T. Una incubación de 10 minutos con buffer fosfatasa 0.1 M Tris, 0.1M NaCl, 5 mM MgCl_2 pH 9.5 se realizó, después de 5 lavados. La reactividad se detectó utilizando solución reveladora BCIP/NBT (Promega, Madison, WI, USA). Membranas y geles teñidos con azul de Coomassie se escanearon y analizaron por densitometría con el software GeneTool (Syngene, Synoptics Ltda, Frederick, MD, USA). Las bandas de Lck (61 y 63 kDa) se normalizaron con una proteína teñida con Coomassie de 225 kDa para comparar la intensidad relativa.

Ensayos de proliferación de linfocitos

5 x 10⁴ de CMSP/pozo de tres diferentes individuos, se sembraron en cajas de 96 pozos de fondo plano por triplicado en medio completo. Los péptidos se adicionaron a diferentes concentraciones 80, 40, 20, 10 μM en un volumen final de 200 μl y se incubaron durante 1 hora a 37°C, en una atmósfera humedificada. Después de la incubación, las células se estimularon con 2 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA-P) o PHA-P más PMA a 50 ng/ml durante 48. Después de esta incubación 0.5 $\mu\text{Ci/pozo}$ [^3H -timidina] (ICN, Irving, CA, USA) se agregó al cultivo por 18 horas adicionales. Las células se cosecharon sobre membranas de fibra de vidrio con un cosechador semi-automático (Cambridge Technology, Watertown, MA, USA) y la radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6500, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). Los resultados se presentan como las cuentas por minuto obtenidas (c.p.m) de incorporación de ^3H -timidina.

Ensayos de viabilidad

La viabilidad celular se determinó por ensayos de exclusión utilizando azul de tripan e ioduro de propidio. 5 x 10⁴ células/pozo CMSP humanas y células Jurkat se sembraron y trataron con los péptidos HK, HKSP y PS a 20 y 40 μM . Después de 2 h y 30 h de incubación se realizaron conteos en cámara de Neubauer

registrando el número de células vivas y muertas (teñidas con azul de Tripán) por cuadrante. El porcentaje de células muertas para cada muestra se calculó como: $[\text{células muertas} / (\text{células viables} + \text{células muertas})] \times 100$.

En los ensayos de viabilidad por exclusión de yoduro de propidio, las células se resuspendieron en 250 μL de PBS y se incubaron con 50 $\mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, se analizó por citometría de flujo en un citómetro FACScan (BD, San José, CA, USA), los análisis se realizaron con el software Cellquest.

Ensayos de Anexina V

5×10^5 CMSP humanas o células Jurkat se incubaron con los péptidos a 20 y 40 μM durante 1 h a 37°C y 5% CO_2 en medio completo. Las células se lavaron 3 veces y se trataron con el kit de detección de apoptosis de anexina V-FITC (Sigma, St Louis, MO, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Un mínimo de 10,000 eventos se adquirieron para cada muestra en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, San José, CA, USA). Los datos se procesaron con el software CellQuest (BD Biosciences, San José, CA, USA).

Fragmentación de DNA

2×10^6 CMSP/pozo se sembraron en cajas de 24 pozos en medio completo y se incubaron con los péptidos HKPS y PS a 20 μM durante 12 h a 37°C en una atmósfera humidificada y con estaurosporina 6 μM como control positivo de la fragmentación de DNA. Las células se lisaron y el DNA se aisló utilizando el kit de purificación de DNA genómico Wizard de Promega (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cantidades iguales de DNA se corrieron en un gel de electroforesis de agarosa que contenía 0.5 mg/L de bromuro de etidio. Seguido a la electroforesis, el gel se visualizó con el software Molecular Imager FX (Biorad, Hercules, CA, USA) y se analizó con el software QuantityOne (Biorad, Hercules, CA, USA).

Análisis estadísticos

Los valores se expresaron como media $\pm$ desviación estándar en los ensayos de actividad enzimática de PKC. Valores para los experimentos de exclusión de azul de tripán y proliferación se expresaron como media $\pm$ medida de error estándar (SEM). La significancia estadística se evaluó en los ensayos de quinasa, viabilidad y linfoproliferación por análisis de una vía de varianza (ANOVA) y una prueba de Bonferroni para determinar la significancia de las comparaciones entre los grupos de tratamientos a diferentes concentraciones. Diferencias en los ensayos de PKC entre grupos no-activados y activados se analizaron con una t pareada. Se usó la versión Intercooled del programa Stata 6.0 (College Station, TX, USA). $P < 0.05$ (*) y $P < 0.01$ (**) se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplos Biológicos

Ejemplo 1. Internalización de los péptidos HK y HKPS

La internalización del péptido permeable, denominado HK, en una forma independiente de receptores ha sido demostrada (Lin y col., 1995; Liu-Yan y col., 2000) así como la capacidad inhibitoria del pseudosustrato de PKC (Oancea y Meyer, 1998). Para el péptido quimérico era importante verificar ambas funciones: penetración e inhibición de la actividad enzimática. La comprobación de la internalización de las secuencias peptídicas se detectó por citometría de flujo utilizando los péptidos marcados con FITC y cuantificando el porcentaje de radiomarcaje internalizado en CMSP preincubadas con el péptido HKPS marcado con ^{125}I . En los ensayos de fluorescencia se encontró que los péptidos HK y HKPS

muestran un incremento dosis dependiente sobre la media de la fluorescencia en las células tratadas con los péptidos marcados con FITC. En las células tratadas con PS no se evidencia internalización. En los ensayos de marcaje de HKPS con ^{125}I , se observó un porcentaje de internalización del 3% después de 1 hora de incubación.

Ejemplo 2. Inhibición de la actividad de la PKC

La actividad quinasa de las isoformas clásicas de la PKC se evaluó *in vitro* sobre PKC purificada de cerebro de rata en condiciones de activación y no activación, para los tres péptidos. En ambas condiciones, reducción de la actividad quinasa se observó en la presencia del péptido PS, pero se conserva la capacidad de la PKC para aumentar su actividad en presencia de los activadores fosfatidilserina y diacilglicerol. HKPS inhibió completamente la PKC y anulo la respuesta a los activadores. El péptido HK redujo también la actividad de la PKC probablemente por sus propiedades hidrofóbicas, pero se conserva la capacidad de respuesta a los activadores. Es importante anotar que el péptido quimérico tiene un efecto inhibitorio mayor al inhibidor natural, la secuencia pseudosustrato, lo que refuerza la idea de su utilización como un potente inhibidor de la PKC.

Ejemplo 3. Reducción en la fosforilación de Lck

Lck una proteína tirosina quinasa, predominante en células T es fosforilada por PKC. El cambio de la movilidad electroforética de Lck después del tratamiento con PMA está muy bien documentado (Veillette y col., 1988); una banda de 61 kDa y otra de 63 kDa son el resultado de la fosforilación de Lck por MAPK y por PKC respectivamente (Winkler y col., 1993). El patrón de fosforilación de Lck en lisados de CMSP se evaluó luego de la incubación con HKPS a varias concentraciones y estimuladas con PMA, un ester de forbol que activa la PKC. HKPS redujo progresivamente la relación de las bandas p63:p61 a medida que aumentó la concentración del péptido, así como los niveles de la banda 63 de Lck inducida por el PMA y su relativa intensidad con respecto a la banda 61.

Ejemplo 4. Inhibición de la proliferación

La estimulación de CMSP con los mitógenos PHA y PMA activa entre muchas otras la vía de la PKC. La proliferación de CMSP se evaluó en células estimuladas con PHA y PHA más PMA, que previamente habían sido tratadas con HKPS y PS a varias concentraciones. A una concentración de 80 μM HKPS redujo 150 y 57 veces respectivamente la proliferación en células estimuladas con PHA y PHA más PMA. A 40 μM HKPS redujo casi 4 veces la proliferación en ambas condiciones. Concentraciones menores a 20 μM no tuvieron un efecto antiproliferativo. PS no tuvo ningún efecto sobre la respuesta mitogénica, incluso a 80 μM .

Ejemplo 5. Reducción en la viabilidad

La inducción de apoptosis se evaluó por experimentos de exclusión con azul de tripán y con yoduro de propidio. Se observó un claro aumento relacionado con la concentración de HKPS en la tinción de yoduro de propidio en las células tratadas con respecto a las no tratadas o tratadas con PS.

El fenotipo multirresistente a drogas antineoplásicas ha sido asociado a la sobreexpresión de la isoforma α de la PKC (Cloud-Heflin BA y col., 1996). La línea celular Jurkat muestra una mayor expresión de PKC que los linfocitos aislados de pacientes sanos (Lisowska K y col., 2003). En estas células se evaluó la viabilidad en presencia de los péptidos HK, HKPS y PS a diferentes concentraciones

después de 2 y 30 h de incubación. Las células Jurkat incubadas durante 2 h con el péptido HKPS mostraron una pérdida de la viabilidad celular no observada con los péptidos HK y PS. Posterior a las 30 h de incubación se muestra un aumento en el compromiso de la viabilidad de las células Jurkat a las distintas concentraciones probadas con el péptido HKPS, respecto del mostrado a las 2 h. La disminución en la viabilidad celular es drástica a la concentración de 80 μM : menos del 20% de viabilidad a las 2 h y menos del 10% a las 30 h. Al comparar las sensibilidades al péptido HKPS se observó que en CMSP de humano los resultados de viabilidad con HKPS fueron similares a los presentados en células Jurkat después de 2 h de incubación a las concentraciones de 20 y 40 μM . Pero después de 30 horas de incubación con el HKPS el porcentaje de viabilidad fue mucho más bajo para las CMSP (~60% y ~40% a concentraciones de 20 y 40 μM) comparado con el de la células Jurkat tratadas con el mismo péptido a las 30 h (~70% y ~60% a concentraciones de 20 y 40 μM) mostrando una mayor sensibilidad de las CMSP al péptido.

Ejemplo 6. Inducción de apoptosis

Características de la apoptosis incluyen disminución volumen celular, exposición de fosfatidilserina y fragmentación de DNA. Células Jurkat tratadas con HKPS a 40 μM fueron positivas para anexina V e ioduro de propidio, a 20 μM solo fueron positivas para anexina V. Las CMSP presentaron una mayor fluorescencia a anexina V e ioduro de propicio a 40 μM pero también fueron positivas para ioduro de propicio a 20 μM . La fragmentación de DNA se evaluó también. El patrón de fragmentación obtenido con HKPS a 20 μM fue similar al que produce la estaurosporina (Assefa y col., 2004; O'Connell y col., 2006), control positivo de la fragmentación.

CAMPO TECNICO

Esta invención esta relacionada con el campo de los péptidos permeables o dominios de transducción proteica que pueden llevar consigo secuencias funcionales específicas cargo para modular actividades moleculares intracelularmente y funciones celulares. Más específicamente, esta invención es un péptido quimérico que inhibe la actividad enzimática de la proteína quinasa C (PKC). Este péptido induce apoptosis en células del sistema inmunitario y en una línea leucémica T, que tiene una mayor actividad de esta enzima. Adicionalmente, es inhibitorio en otros procesos en los cuales esta enzima juegue un papel fundamental, por ejemplo, durante la invasión del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, el cual utiliza esta actividad para poder penetrar los glóbulos rojos. El péptido reduce drásticamente la infección por *Plasmodium*.

Los componentes y composiciones farmacéuticas que tengan estos compuestos, podrían ser usados en el tratamiento del cáncer en combinación con quimioterapia u otras drogas, así como una droga antimalárica.

ESTADO DEL ARTE DE LA INVENCION

Los péptidos permeables a las células o dominios de transducción protéica son definidos como secuencias de un tamaño considerable (mayores de 600 Da), con la particular característica que pueden atravesar las membranas de diferentes tipos celulares llevando consigo otras moléculas (cargo) permitiendo la regulación, estimulación o inhibición de funciones específicas intracelulares. Estos péptidos permeables han sido clasificados de acuerdo a su origen en: derivados de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-), de homeoproteínas y de secuencias señal (Lindgren y col., 2000).

Los péptidos permeables derivados de la proteína Tat se describieron al observar la capacidad de un dominio de la proteína Tat del VIH-1 de internalizarse espontáneamente en células (Green y col., 1988; Frankel y col., 1988) y además de conservar su capacidad natural de localizarse en el núcleo y transactivar el promotor viral LTR (Green y col., 1988; Frankel y col., 1988; Vivés y col., 1997). Posteriormente, se demostró la capacidad de estos péptidos de penetrar *in vivo* a diversos tejidos y en las células al administrarse intraperitonealmente en ratones (Fawell y col., 1998; Schwarze y col., 1999). Esta secuencia se ha usado además en la supresión de la expresión génica (Mortlock y col., 2003), y como coadyuvante en la transferencia de DNA plasmídicos (Hellgren y col., 2004).

Los péptidos permeables derivados de homeodominios, se identificaron en una secuencia de 60 aminoácidos perteneciente al homeodominio de *Antennapedia* que era capaz de translocarse a través de las membranas neuronales para converger en el núcleo (Joliot y col., 1991). Luego se determinó que la cantidad mínima de residuos para permitir este tipo de actividad, era una secuencia activa de 16 aminoácidos con una estructura de hélice alfa (Derossi y col., 1994), conformación característica de las regiones transmembranales de las proteínas.

Posteriormente, se describió la capacidad de penetrar las células para una región de la denominada secuencia señal o secuencia de translocación membranal presente en el extremo amino terminal de la mayoría de proteínas secretoras o transmembranales, que ayuda a dirigir la proteína desde la maquinaria de traducción hacia su destino. La región con la característica de penetración corresponde al segmento hidrofóbico de la secuencia señal. Entre las secuencias descritas están las correspondientes al factor del crecimiento de los fibroblastos de kaposi (FGF-K), a la integrina $\beta 3$ (Shenoi y col., 1999; Hawiger y col., 1999; Waizenegger y col., 2002), a la secuencia fusión gp 41 del HIV-1 (Morris y col., 1997) y a la secuencia señal de la cadena liviana de la Ig(v) del *Caiman coccodylus* (Lindgren y col., 2000). Para la secuencia hidrofóbica del FGF-K se ha demostrado la internalización en células en diversos tipos celulares, entre ellos células endoteliales, macrófagos (Liu y col., 2000), linfocitos T (Torgerson y col., 1998) y fibroblastos (Liu y col., 1996). Se ha probado con éxito la internalización de la secuencia hidrofóbica de integrina $\beta 3$ en células adherentes y fibroblastos (Liu y col., 1996); igualmente, la secuencia de fusión del HIV en fibroblastos y mioblastos (Morris y col., 1999).

El modelo propuesto para explicar la translocación de estos péptidos permeables acoge la hipótesis de una interacción directa del péptido con los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente, a través de aminoácidos básicos y luego una estructuración helicoidal alfa, que le permitiría atravesar la bicapa hacia el interior celular. Este modelo se sustenta en los hallazgos de un mecanismo independiente de ATP (Joliot y col., 1991; Lin y col., 1995), de receptores (Derossi y col., 1996) y diferente de la endocitosis (Derossi y col., 1994; Vivés y col., 1997; Hawiger y col., 1999). Por otro lado, en estudios con difracción circular se muestra evidencia de que los péptidos adquieren una estructura alfa al ponerse en contacto con la membrana (Du y col., 1998; Christiaens y col., 2004). En contraposición, se encuentran resultados obtenidos por diversos grupos que muestran la imposibilidad de estos péptidos de atravesar bicapas por si mismos (Thoren y col., 2004), sugiriendo un mecanismo endocítico para la internalización de estos péptidos (Ross y col., 2004).

Algunos ejemplos de las aplicaciones de la técnica de liberación de péptidos permeables al interior celular son el bloqueo funcional de vías de señalización como la translocación del factor transcripcional NF- κ B posterior a la estimulación con TNF α y LPS en macrófagos (Lin y col., 1995); la inhibición de la vía de las MAPK o de quinasa dependiente de mRNA en fibroblastos (Kelemen y col., 2002; Nekhai y col., 2000); el bloqueo de la interacción entre dominios SH2 en este mismo modelo (Rojas y col., 1997). También, se ha evidenciado el bloqueo de la producción de las citoquinas IFN γ y TNF α en macrófagos estimulados, mediante la

introducción de la secuencia de localización nuclear del NF- κ B unida a una de estas secuencias señal (Liu y col., 2000) y la introducción de antígenos exógenos, que normalmente serían presentados en contexto de CMH de clase II, para ser presentados como intercelulares en contexto de CMH de clase I en células de mastocitoma y fibroblastos (Schutze-Redelmeier y col., 1996). La liberación de oligonucleótidos se ha demostrado con el uso de la secuencia gp41 unido a un RNA antisentido para la cdc25, evidenciándose un efecto sobre el ciclo celular de fibroblastos y mioblastos (Morris y col., 1999).

Dado el alto potencial de los péptidos permeables para liberar al interior celular secuencias funcionales para modular un proceso intracelular específico, esta metodología fue aplicada para introducir una secuencia autorreguladora negativa o pseudosustrato de la proteína quinasa C (PKC), que *in vivo* mantiene inactiva la enzima en ausencia de los cofactores requeridos. La proteína quinasa C (PKC) es una serina treonina quinasa que comprende 11 isoformas que han sido clasificado en tres subgrupos: clásicas (α , β I, β II y γ), nuevas (δ , ϵ , η y θ) y atípicas (ι/λ , ζ). Las diferentes isoformas de la PKC median el mantenimiento celular, la proliferación y la apoptosis así como otras funciones regulatorias para mantener la homeostasis en el sistema inmune (Clemens y col., 1992; Tan y Parker, 2003; Spitaler y Cantrell, 2004).

Diversos estudios sobre las secuencias pseudosustrato de la PKC muestran asociación directa entre estas y los lípidos ácidos de la membrana a través de los aminoácidos básicos que las componen (Mosior M. y col., 1991), lo que las involucra además en el mecanismo de translocación de la PKC desde el citoplasma hacia la membrana celular. En diversos estudios se ha usado este dominio después de permeabilizar las células (O'Brian CA y col., 1990; Eickholtz T y col., 1993) o acoplado a otras secuencias permeables, para inhibir la señal de PKC en células en cultivo (Théodore L y col., 1995). La inhibición de PKC comúnmente se realiza utilizando inhibidores como la estaurosporina, rottlerina y GP109203X, los cuales inhibiendo efectivamente la PKC afectan la función de otras quinasas (Webb y col., 2000; Spitaler y Cantrell., 2004).

RESUMEN Y EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN.

**PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA C E INDUCTOR DE
APOPTOSIS**

RESUMEN

En primera instancia, la presente invención provee un nuevo péptido, con la siguiente secuencia de aminoácidos: AAVALLPAVLLALLAPRKGALRQY y sales farmacológicamente aceptables o derivadas de este podría ser aceptado como medicamento antineoplásico o como herramienta en el pronóstico de la respuesta al tratamiento de pacientes del servicio de oncología. También puede utilizarse como droga antimalárica con la ventaja que ejerce su efecto en dos estadios diferentes de desarrollo del parásito.

Este nuevo péptido sintético tiene una naturaleza hidrofóbica. Este péptido con una longitud de 24 aminoácidos, denominado HKPS, se transloca al interior celular, inhibe la actividad quinasa de la PKC, inhibe la proliferación en células del sistema inmunitario, inhibe la fosforilación de un sustrato específico de la PKC en células T intactas, reduce la viabilidad en células del sistema inmunitario y en una línea celular T e induce apoptosis en células del sistema inmunitario y en una línea celular T a altas concentraciones del péptido quimérico. Además inhibe el crecimiento y la invasión de glóbulos rojos por el parásito de la malaria.

La presente invención provee el uso del péptido en la manufactura de una droga o composición farmacéutica con actividad antineoplásica.

En segunda instancia, la presente invención provee una composición farmacéutica, que comprende el péptido de la presente invención como principio activo de un medicamento antineoplásico, junto con un acarreador farmacéuticamente aceptable.

En tercera instancia, la presente invención también provee una herramienta que pueda ser utilizada para predecir la respuesta de pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia u otros tratamientos.

En cuarta instancia, la presente invención provee una composición farmacéutica con actividad antimalárica.

En quinta instancia, la presente invención provee una composición farmacéutica, que comprende el péptido de la presente invención como principio activo de una droga antimalárica, junto con un acarreador farmacológicamente aceptable.

REIVINDICACIONES

**PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA C E INDUCTOR DE
APOPTOSIS**

REIVINDICACIONES

Compuesto de la fórmula (I):

En la que:

1. Un péptido de 24 aminoácidos, caracterizado por tener la siguiente secuencia de aminoácidos: AAVALLPAVLLALLAPRKGALRQY, y sales aceptables farmacológicamente derivadas de este.
2. El péptido de acuerdo a la reivindicación 1, se caracteriza por inhibir dramáticamente la PKC afectando la proliferación y supervivencia de células T y células Jurkat.
3. El péptido de acuerdo a la reivindicación 1, se caracteriza por inhibir el desarrollo, crecimiento e invasión de Plasmodium por su capacidad de inhibir la PKC.

En segunda instancia, la presente invención provee una composición farmacéutica, que comprende el péptido de la presente invención como principio activo de un medicamento antineoplásico, junto con un acarreador farmacológicamente aceptable.

En tercera instancia, la presente invención también provee una herramienta que pueda ser utilizada para predecir la respuesta de pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia u otros tratamientos.

En cuarta instancia, la presente invención provee una composición farmacéutica con actividad antimalárica en dos estadios diferentes del parásito aumentando su efectividad.

En quinta instancia, la presente invención provee una composición farmacéutica, que comprende el péptido de la presente invención como principio activo de una droga antimalárica, junto con un acarreador farmacológicamente aceptable.

**COMPROBANTE DE PAGO DE LA TASA DE
PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD.**

**PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA C E INDUCTOR DE
APOPTOSIS**

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACION SOLICITUD DE PATENTE DE MODELO DE UTILIDAD	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl:	
22) Fecha de solicitud: FEBRERO 6 de 2009		(71) Solicitante(s)	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad 32) Fecha (33) País		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	
		(72) Inventor(es)	
		JEAN PAUL VERNOT HERNANDEZ	
		(74) Apoderado:	
		JULIO CESAR RAMIREZ PIÑA	
(54) Título: PEPTIDO QUIMERICO INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA C E INDUCTOR DE APOPTISIS			

Resumen - Reivindicación(es) :
VER DOCUMENTO ANEXO

18

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-011561- -00000-0000

Fecha: 2009-02-08 16:37:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 18

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 9,893
FECHA : FEBRERO 6 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALEXANDER BARRETO	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	108007675	05/02/2009	1,678,000.00
ALEXANDER BARRETO	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	108007686	05/02/2009	2,064,000.00
ALEXANDER BARRETO	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	108007690	05/02/2009	135,000.00
ALEXANDER BARRETO	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	108007701	05/02/2009	436,000.00

***** CONCEPTO *****

NT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** 25% TRAMITES DE SOL. DE PATENTE D	135,000.00
	TOTAL :	\$ 135,000.00

SON: CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



No. 09-011561- -00000-0000

Fecha: 2009-02-06 16:37:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 18

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒INCOMPLETA ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RAMIREZ PIÑA JULIO CESAR

REFERENCIA	Radicación No. 09 11561
	Trámite 2
	Evento 1
	Actuación 430
	Oficio No. Nº 08078

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

1. Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
2. El solicitante debe allegar el anexo para reducción de tasas para solicitudes presentadas por personas que carezcan de recursos económicos, debidamente diligenciado.
3. Debe presentar un nuevo capítulo reivindicatorio precisando la materia para la cual se solicita protección. Las reivindicaciones deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas con la descripción. Por su estructura, se compone de: a) un preámbulo, el cual sirve para situar el objeto de la invención dentro de un contexto técnico; y b) una parte característica, que define lo que se considera novedoso y se desea proteger. Estas dos partes están separadas por la expresión "caracterizada por" u otra equivalente. Deben definirse claramente las características que lo distinguen de los restantes conocidos, sin describir ventajas de funcionamiento o uso, sólo se debe caracterizar técnicamente.
4. El solicitante deberá allegar al expediente la fórmula del compuesto del cual solicita la concesión de la patente.
5. Como guía para la redacción puede consultar la página web de la SIC (<http://www.sic.gov.co/propiedad/PropiedadInd.php>) en la sección Patentes/como solicitar una patente/como redactar la solicitud y ver los ejemplos o solicitar una orientación en la Superintendencia de Industria y Comercio.
6. Anexo al presente requerimiento se dan algunas recomendaciones, de carácter informativo, basados en el artículo 28 y 30 de la Decisión 486, sobre la información que debe incluir la descripción y las reivindicaciones.
7. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la

Continúa en la página siguiente...

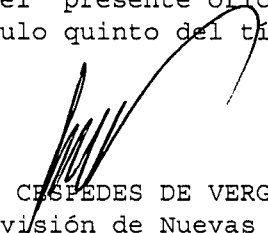
REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 11561

Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 16 JUL 2009
jfernand

EJEMPLO DE LAS REIVINDICACIONES

REIVINDICACIONES

REIVINDICACIÓN INDEPENDIENTE:
características esenciales la invención

1. Sacacorchos, caracterizado por estar compuesto de un cuerpo principal o palanca (1), en cuya parte intermedia se sitúa una rosca helicoidal o tirabuzón (3) abatible mediante un eje de sujeción (2), y en el extremo de este cuerpo principal existe otro eje (7) por el que bascula un brazo acanalado (8) acabado en forma de convexa (17) para servir de punto de apoyo al cuello de la botella y que posee en los laterales y enfrentados entre sí unas ranuras (12) por las que se deslizan las prolongaciones establecidas a tal efecto del citado eje (7).

Preámbulo: Indica el
objeto de la invención

Parte caracterizadora:
Indica las
características nuevas
que aporta la invención

REIVINDICACIONES DEPENDIENTES:
Concreta elementos técnicos de las reivindicaciones de las que depende

2. Sacacorchos, según la reivindicación 1, caracterizado porque las ranuras (12) existentes en el brazo acanalado (8), están diseñadas para que las prolongaciones del eje (7) queden trabadas en dos o más encajes.

3. Sacacorchos, según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque posee un resorte (9) en su parte interna sujetado en la parte extrema (11) del brazo principal o palanca (1), y su otro extremo aproximadamente en la parte media (10) del brazo acanalado (8), el resorte, se apoya en su parte intermedia en el eje (7) en el que basculan los dos brazos, y según sea la posición de abierto o cerrado del mecanismo, produce una leve presión para que se enclave en ambas posiciones.

4. Sacacorchos, según la reivindicación 3, caracterizado porque el resorte (9) en posición de abierto provoca la unión de los brazos entre sí.

5. Sacacorchos, según la reivindicación 3, caracterizado porque el resorte (9) en posición de trabajo hace que el brazo acanalado (8) tienda a presionar hacia la rosca helicoidal o tirabuzón (3).

6. Sacacorchos, según la reivindicación 5, caracterizado porque por lo menos uno de los laterales del brazo acanalado (8) puede terminar con el canto acabado afilado (13) para el desprecintado de las cápsulas o precintos.

7. Sacacorchos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las ranuras guía (12) pueden disponer de uno o más puntos de apoyo del eje (7).

8. Sacacorchos, según la reivindicación 7, caracterizado porque el brazo acanalado (8) puede disponer sendas prolongaciones en forma de gancho (18) para extraer tapones corona.