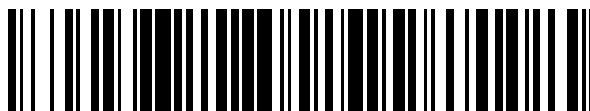


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 240**

21 Número de solicitud: 201130116

51 Int. Cl.:
C07K 14/575 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **31.01.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.09.2012

71 Solicitante/s:
**FUNDACIÓN RIOJA SALUD
EDIFICIO CIBIR, C/ PIQUERAS 98
26006 LOGROÑO, LA RIOJA, ES**

72 Inventor/es:
**MARTINEZ RAMIREZ, ALFREDO y
LARRAYOZ ROLDAN, IGNACIO**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

54 Título: **PÉPTIDO CAPAZ DE AUMENTAR LA VELOCIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE UNA KINESINA O SU HOMÓLOGA FUNCIONAL SOBRE MICROTÚBULOS.**

57 Resumen:

La presente invención es un péptido capaz de aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos. Dicha kinesina puede estar aislada de un hongo, una planta, un díptero, un cefalópodo, un invertebrado o un vertebrado, preferiblemente humano y la homóloga funcional puede estar aislada de un organismo procariota. Los microtúbulos pueden estar aislados de un hongo, una planta, un invertebrado o un vertebrado, preferiblemente humano, bovino, porcino, ovino, caprino y equino. El péptido de la invención es útil en un procedimiento para aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos y en un dispositivo, preferiblemente un biosensor o un dispositivo de transporte de moléculas, que comprende un péptido de la invención, una kinesina o su homóloga funcional, microtúbulos y ATP sobre un soporte, preferiblemente vidrio o SiO₂.

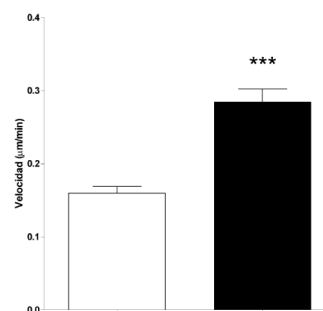


FIG. 8

DESCRIPCION

Péptido capaz de aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención es un péptido capaz de aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos. Este aumento de actividad de la kinesina tiene aplicación para mejorar las prestaciones de nanodispositivos (biosensores, lab-on-a-chip, etc.) en los que se produce un desplazamiento de proteínas motoras sobre microtúbulos o viceversa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los microtúbulos y los motores celulares, entre los que se encuentran las kinesinas, las dineínas, la actina y la miosina, son componentes de gran utilidad en la construcción de nanodispositivos. Las funciones naturales de estas proteínas dentro de la célula las hacen particularmente útiles para gran cantidad de aplicaciones en nanomecánica. Los microtúbulos son largos polímeros de monómeros globulares de tubulina α y β , que en la célula constituyen el componente mayoritario del citoesqueleto. Su estructura les permite actuar como varillas rígidas sobre las que se deslizan los motores celulares, definiendo la dirección en que éstos se mueven. Por otro lado, los motores celulares son moléculas con capacidad ATPasa que se unen por un extremo a vesículas, orgánulos u otros componentes celulares y que, mediante el uso de energía generada por la hidrólisis del ATP, arrastran su carga a lo largo del microtúbulo por el que se deslizan.

- 20 Los nanodispositivos son dispositivos de muy pequeño tamaño que utilizan estructuras moleculares para transportar, modificar y procesar reactivos o componentes a muy pequeña escala. Estos nanodispositivos pueden ser utilizados para diversas aplicaciones entre las que destacan la microfluídica, los biosensores, el transporte de moléculas, el montaje de componentes a nivel molecular y otras.

- 25 Por ejemplo, se han desarrollado biosensores para detección de toxinas o moléculas alimentados por ATP y dirigidos por kinesina (Bachand, G.D. 2009 "Smart dust" biosensors powered by biomolecular motors. Lab Chip 9:1661-1666). Algunos nanodispositivos construyen una senda a base de microtúbulos sobre los que se desliza un motor celular al que se ha unido la partícula a transportar (Bottier, C. et al. 2009 Active transport of oil droplets along oriented microtubules by kinesin molecular motors. Lab Chip 9:1694-1700) mientras que en otros casos se inmovilizan los motores celulares en una superficie sólida y se hace deslizar a los microtúbulos sobre ellos, siendo en este caso el microtúbulo quien se encarga de transportar la carga (Du, Y.Z. et al. 2005 Motor protein nano-biomachine powered by self-supplying ATP. Chem. Commun. 2080-2082).

- 30 El gen *adm* codifica la información necesaria para la síntesis de una proteína de 185 aminoácidos (en humanos), que recibe el nombre de pre-pro-adrenomedulina. Esta proteína se procesa dentro de la célula y da origen a dos péptidos con funcionalidad biológica: la adrenomedulina y el péptido de 20 aminoácidos identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2, que está amidado en su extremo carboxilo terminal. La estructura tridimensional del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 ha sido obtenida mediante técnicas de resonancia magnética nuclear y consiste en una hélice α que se extiende a lo largo de sus 20 aminoácidos. El péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 funciona como señal extracelular de comunicación endocrina, paracrina o autocrina y regula actividades propias del citoesqueleto. Se ha demostrado que el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 decora los microtúbulos en gran cantidad de células, tiene interacciones directas con la tubulina y modifica la cinética de polimerización de los microtúbulos y otras funciones celulares, tales como el ciclo celular o la motilidad de las células.

- 40 El documento más cercano del estado de la técnica es Sackett et al. (Sackett, D.L. et al 2008 Intracellular proadrenomedullin-derived peptides decorate the microtubules and contribute to cytoskeleton function. Endocrinology 149:2888-2898). En este documento se describe que el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 es capaz de unirse a la tubulina y la kinesina, pero en este documento no se describe el efecto de dicho péptido sobre la actividad ATPasa de la kinesina ni sobre la velocidad y la potencia de desplazamiento de la kinesina respecto a los microtúbulos.

45 El problema que plantea la técnica es aumentar la velocidad con que se mueve la kinesina respecto a los microtúbulos. La solución que propone la presente invención consiste en un procedimiento para aumentar dicha velocidad de desplazamiento que comprende poner en contacto microtúbulos, ATP, dicha kinesina y un péptido de fórmula (I).

DESCRIPCION DE LA INVENCION

- 50 La presente invención es un péptido capaz de aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos, de fórmula:

R-X

(I)

donde:

- X está identificado por la SEQ ID NO: 1,
- R es H o está identificado por la SEQ ID NO: 9.

5 En la presente invención, se entiende por “aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina” a conseguir una velocidad de desplazamiento, medible en unidades $\mu\text{m}/\text{min}$, de una kinesina sobre los microtúbulos en presencia de los péptidos de la invención y cuyo valor es superior al menos en 0,001 $\mu\text{m}/\text{min}$ al valor de la velocidad de desplazamiento de una kinesina respecto a los microtúbulos en ausencia de dichos péptidos.

10 Los péptidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2 son realizaciones de los péptidos de la invención, siendo la longitud de SEQ ID NO: 1 de 9 aminoácidos y la de SEQ ID NO: 2 de 20 aminoácidos. Un péptido con una homología de secuencia del 95%, 90%, 75% respecto a un péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 tiene 19, 18 y 15 aminoácidos iguales, respectivamente, al péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Por tanto, otra realización es un péptido de la invención que tiene una homología de secuencia del 95% respecto al péptido de fórmula (I).

15 Otra realización es un péptido de la invención en que dicha homología de secuencia es del 90%. Otra realización es un péptido de la invención en que dicha homología de secuencia es del 75%. Y otra realización es el péptido de la invención en que dicha homología de secuencia es del 75% y dicho R está identificado por la SEQ ID NO: 10.

Un péptido con una homología de secuencia del 88% y 77% respecto a un péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 tiene 8 y 7 aminoácidos iguales, respectivamente, al péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1. Por tanto, otra realización es un péptido de la invención en que dicha homología de secuencia es del 88%. Y otra realización de la invención es un péptido de la invención en que dicha homología de secuencia es del 77%.

20 Una realización más preferible es un péptido de la invención, en que la concentración de dicho péptido es entre 1 y 10 μM .

25 Una realización preferible es un péptido de la invención, en que dicha kinesina está aislada de un hongo o una planta. Otra realización más es el péptido de la invención, en que dicha kinesina está aislada de un invertebrado, preferiblemente un díptero o un cefalópodo. Otra realización es un péptido de la invención, en que dicha kinesina está aislada de un vertebrado, preferiblemente humano.

Una realización preferible es un péptido de la invención, en que dicha homóloga funcional de la kinesina está aislada de un organismo procariota.

30 Otra realización de la invención es un péptido, en que dichos microtúbulos están aislados de un hongo o una planta. Otra realización más es el péptido de la invención, en que dichos microtúbulos están aislados de un invertebrado. Otra realización es un péptido de la invención, en que dichos microtúbulos están aislados de un vertebrado, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente seleccionado entre el grupo compuesto por humano, bovino, porcino, ovino, caprino y equino.

35 La kinesina utiliza la hidrólisis del ATP para avanzar a lo largo del microtúbulo. De hecho, se ha comprobado que la kinesina avanza 8 nanómetros por cada molécula de ATP que hidroliza (Yildiz A, et al. 2008 Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. Cell 134:1030-1041).

La velocidad de desplazamiento de la kinesina respecto a los microtúbulos aumenta en presencia de los péptidos identificados por la secuencia SEQ ID NO: 1 y 2, dicha velocidad de desplazamiento aumenta 1,8 veces cuando se añade el péptido identificado por la SEQ ID NO:1 y aumenta 1,4 veces cuando se añade el péptido identificado por la SEQ ID NO:2.

40 Un aumento en la actividad ATPasa y en la velocidad de desplazamiento respecto a los microtúbulos de una kinesina implica, a su vez, un aumento de potencia. La potencia se define como el cociente entre trabajo y tiempo, siendo el trabajo la fuerza aplicada por el desplazamiento. La hidrólisis de ATP proporciona la fuerza necesaria para mover a la kinesina. Por lo tanto, a mayor energía gastada, mayor potencia debe esperarse en el sistema (salvo que se disperse en forma de calor). La potencia de la kinesina también aumenta si aumenta la velocidad de la kinesina, puesto que la potencia es directamente proporcional a la velocidad.

45 De forma que una realización más de la invención es un péptido capaz de aumentar la potencia de dicha kinesina.

50 Tanto el precursor biológico (péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 3, donde el grupo amida está sustituido por el aminoácido glicina) como el péptido carente de grupo amida (péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 8, ácido libre) carecen de la capacidad de aumentar la actividad ATPasa de la kinesina 1 (Fig. 2), demostrando que el grupo amida de los péptidos de la invención es necesario para aumentar la actividad ATPasa de la kinesina.

El péptido de menor tamaño que aumenta la actividad ATPasa de la kinesina es el péptido de 9 aminoácidos identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 (resultados mostrados en Fig. 10). El aumento de actividad ATPasa promovido por este péptido es similar al que se obtiene con el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Los

péptidos de menor tamaño (péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 7 y péptido identificado por la secuencia LSR-NH₂) no aumentan la actividad ATPasa de la kinesina.

El péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 es capaz de incrementar entre 2 y 3 veces la actividad ATPasa de distintas kinesinas humanas: kinesina 1, cromokinesina, CENP-E y Eg5. El péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 también es capaz de incrementar entre 2 y 3 veces la actividad ATPasa de la kinesina 1, Eg5, CENP-E y cromokinesina.

El péptido de ratón (*Mus musculus*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 4 produjo un aumento de la actividad ATPasa de la kinesina 1 semejante al inducido por el péptido humano identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Sin embargo, el péptido de pollo (*Gallus gallus*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 5 y el péptido de pez (*Fugu rubripes*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 6 no aumentaron dicha actividad y la disminuyeron ligeramente. Los péptidos de aves y peces carecen del grupo carboxilo-terminal amidado y, dado que se ha observado cómo el grupo amida del extremo carboxilo-terminal de los péptidos es necesario para mejorar la actividad ATPasa de la kinesina 1, es posible que estos péptidos no aumenten la actividad de la kinesina 1 por carecer del grupo amida.

Una realización más de la invención es un procedimiento para aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos, que comprende poner en contacto microtúbulos, dicha kinesina, ATP y un péptido de la invención

La presente invención puede aplicarse en nanodispositivos en los que se produce un desplazamiento de cargas respecto a los microtúbulos para aumentar la velocidad de desplazamiento de la kinesina respecto a los microtúbulos. También puede aplicarse en dichos nanodispositivos para que la kinesina o los microtúbulos transporten cargas mayores.

De forma que una realización más de la invención es un dispositivo que comprende al menos un péptido de la invención, una kinesina o su homóloga funcional, microtúbulos y ATP sobre un soporte

Una realización preferible es un dispositivo de la invención, en que dicho soporte es vidrio o SiO₂. Y otra realización más es un dispositivo de la invención, en que dicho dispositivo es un biosensor o un dispositivo de transporte de moléculas.

Una realización preferible es un dispositivo de la invención, en que dicha kinesina está aislada de un hongo o una planta. Otra realización más es el dispositivo de la invención, en que dicha kinesina está aislada de un invertebrado, preferiblemente un díptero o un cefalópodo. Otra realización es un dispositivo de la invención, en que dicha kinesina está aislada de un vertebrado, preferiblemente un humano.

Una realización preferible es un dispositivo de la invención, en que dicha homóloga funcional de la kinesina está aislada de un organismo procariota.

Otra realización más es un dispositivo de la invención, en que dichos microtúbulos están aislados de un hongo o una planta. Otra realización más es el dispositivo de la invención, en que dichos microtúbulos están aislados de un invertebrado. Otra realización es un dispositivo de la invención, en que dichos microtúbulos están aislados de un vertebrado, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente seleccionado entre el grupo compuesto por humano, bovino, porcino, ovino, caprino y equino.

El aumento de la velocidad de la kinesina sobre microtúbulos producido por los péptidos de la invención es nuevo. No se había descrito en la técnica que esta proteína fuera capaz de aumentar su velocidad de desplazamiento por la adición de moléculas externas. Sólo se habían descrito cambios en su velocidad cuando se modificaban los cofactores necesarios para el proceso, tales como la concentración de ATP, de Mg²⁺, o la temperatura de la reacción. El descubrimiento de esta mejora en la velocidad de la kinesina no estaba por tanto sugerido por la técnica y ha resultado sorprendente para los solicitantes. Este aumento de la velocidad de la kinesina sobre microtúbulos en presencia de los péptidos de la invención constituye además una ventaja técnica sobre la kinesina en ausencia de dichos péptidos y esta ventaja técnica otorga actividad inventiva a la presente invención.

TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

A continuación se indica el texto libre de cada una de las secuencias de la lista:

SEQ ID NO: 1: residuos 12-20 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2: péptido derivado de la pro-adrenomedulina de *Homo sapiens*; C-terminal está amidado.

SEQ ID NO: 3: precursor biológico de SEQ ID NO: 2. La glicina sustituye al grupo amida del C-terminal.

SEQ ID NO: 4: péptido derivado de la pro-adrenomedulina de *Mus musculus*; C-terminal está amidado.

SEQ ID NO: 5: péptido derivado de la pro-adrenomedulina de *Gallus gallus*.

SEQ ID NO: 6: péptido derivado de la pro-adrenomedulina de *Fugu rubripes*.

SEQ ID NO: 7: residuos 13-20 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 8: ácido libre de SEQ ID NO: 2; C-terminal no está amidado.

SEQ ID NO: 9: residuos 1-11 de SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 10: residuos 1-11 de SEQ ID NO: 4.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Actividad ATPasa de la kinesina 1 en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo, que es proporcional al fosfato generado en la hidrólisis de ATP. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina 1 y los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

10 **Figura 2.** Actividad ATPasa de la kinesina 1 en presencia de los péptidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 2, 3 y 8. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina 1, los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2, los cuadrados dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 8 y las estrellas dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 3.

15 **Figura 3.** Actividad ATPasa de la cromokinesina humana en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la cromokinesina y los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

20 **Figura 4.** Actividad ATPasa de la kinesina humana CENP-E en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina CENP-E y los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

25 **Figura 5.** Actividad ATPasa de la kinesina humana Eg5 en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina Eg5 y los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

30 **Figura 6.** Actividad ATPasa de la kinesina 1 en presencia de los péptidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 2, 4, 5 y 6. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina 1, los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2, las estrellas dicha actividad en presencia del péptido de ratón (*Mus musculus*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 4 y los cuadrados dicha actividad en presencia del péptido de pollo (*Gallus gallus*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 5.

Figura 7. Velocidad de los microtúbulos al desplazarse sobre un césped de kinesinas en ausencia (barra izquierda) y en presencia (barra derecha) del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

35 **Figura 8.** Velocidad de los microtúbulos al desplazarse sobre un césped de kinesinas en ausencia (barra izquierda) y en presencia (barra derecha) del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1.

40 **Figura 9.** Actividad ATPasa de la kinesina 1 en presencia de distintas concentraciones del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina 1, los cuadrados representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 a la concentración 1 μ M, los triángulos dicha actividad en presencia del mismo péptido a la concentración 5 μ M y los círculos huecos dicha actividad en presencia del mismo péptido a la concentración 10 μ M.

45 **Figura 10.** Actividad ATPasa de la kinesina 1 en presencia de distintas concentraciones del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina 1, los cuadrados representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 a la concentración 1 μ M, los triángulos dicha actividad en presencia del mismo péptido a la concentración 5 μ M y los círculos huecos dicha actividad en presencia del mismo péptido a la concentración 10 μ M.

50 **Figura 11.** Actividad ATPasa de la kinesina humana Eg5 en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina Eg5 y los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 a una concentración 10 μ M.

Figura 12. Actividad ATPasa de la kinesina humana CENP-E en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la kinesina CENP-E y los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 a una concentración 10 μ M.

5 **Figura 13.** Actividad ATPasa de la cromokinesina humana en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1. Se representa la absorbancia a 360 nm en función del tiempo. Los círculos rellenos representan la actividad ATPasa control de la cromokinesina y los círculos huecos representan dicha actividad en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 a una concentración 10 μ M.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

10 **Materiales y métodos comunes a los ejemplos 2 a 6**

Los microtúbulos bovinos estabilizados, las diversas formas de kinesina recombinante y los tampones necesarios para el ensayo de actividad ATPasa se adquirieron en la compañía Cytoskeleton (Denver, CO, USA) y el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 en Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA).

Todas las muestras de los ejemplos de la invención se prepararon en el tampón 15 mM PIPES, pH 7.0, 5mM $MgCl_2$.

15 La determinación de la actividad ATPasa de los ejemplos se realizó de la siguiente manera: los reactivos descritos en cada uno de los ejemplos se dispusieron en placas de 96 pocillos y se midió la liberación de fosfato a lo largo del tiempo en un lector de placas (POLARstar Omega, BMG Labtech) a 37°C mediante lecturas de absorbancia a 360 nm.

Ejemplo 1. Construcción de péptidos

20 Se construyeron varios mutantes del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 mediante síntesis química (3P Pharmaceuticals, Pamplona). El grupo amida se sustituyó por un aminoácido glicina (su precursor biológico) o simplemente se eliminó para formar el ácido libre. De estas modificaciones se obtuvieron los péptidos identificados por las siguientes secuencias SEQ ID NO: 3 y 8.

También se construyeron fragmentos de diferentes tamaños de dicho péptido. De estas modificaciones se obtuvieron los péptidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1 y 7 y el péptido identificado por la secuencia LSR-NH₂.

25 Los péptidos de ratón (SEQ ID NO: 4), pollo (SEQ ID NO: 5) y pez (SEQ ID NO: 6) fueron también obtenidos mediante síntesis química (3P Pharmaceuticals, Pamplona).

Ejemplo 2. Comparación de la actividad ATPasa de la kinesina en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 respecto a la actividad control

30 Se prepararon 4 muestras y una muestra control en distintos pocillos de una placa. En cada pocillo se añadieron 20 μ g de microtúbulos estabilizados con taxol 15 μ M, 1 μ g de kinesina 1 humana y péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 a una concentración 7,7 μ M. El control contenía los mismos compuestos a las mismas concentraciones excepto el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

Un resultado representativo de una de las 4 muestras se muestra en la Fig. 1. La Fig. 9 representa resultados a distintas concentraciones (1, 5 y 10 μ M) de péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2.

35 **Ejemplo 3. Comparación de la actividad ATPasa de la kinesina en presencia de péptidos identificados por secuencias modificadas respecto a SEQ ID NO: 2**

40 Se prepararon 3 muestras y una muestra control, en cuadruplicado, en distintos pocillos de una placa. En cada pocillo se añadieron 20 μ g de microtúbulos estabilizados con taxol 15 μ M, 1 μ g de kinesina 1 humana y 10 μ M de los péptidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 2, 3 y 8. El control contenía todos los reactivos a las mismas concentraciones excepto los péptidos. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Respecto a los fragmentos del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2, los resultados de actividad ATPasa obtenidos aparecen recogidos en la tabla que aparece más abajo. La Fig. 10 representa el cambio en actividad enzimática de la kinesina 1 en presencia de distintas concentraciones (1, 5 y 10 μ M) de péptido de 9 aminoácidos identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1.

45

Tabla 1. Resultados de actividad ATPasa

Secuencia	Actividad sobre kinesina*
SEQ ID NO: 1	+
SEQ ID NO: 2	+
SEQ ID NO: 7	-
LSR-NH ₂	-

* Un signo positivo indica un aumento en la actividad ATPasa de la kinesina en presencia del péptido identificado por la secuencia indicada. Un signo negativo indica que la kinesina no cambia su actividad ATPasa en presencia de dicho péptido.

Ejemplo 4. Medida de la velocidad en el movimiento relativo entre los microtúbulos y la kinesina

Se ha utilizado un método de deslizamiento de microtúbulos sobre un césped de kinesinas inmovilizadas, el método del kit "Kinesin Motility Assay (BK027)" de Cytoskeleton (Denver, CO). La tubulina marcada con rodamina se polimerizó en microtúbulos a 35 °C durante 15 minutos. Estos microtúbulos se estabilizaron con taxol, consiguiendo así una población estable de microtúbulos de aproximadamente 5-10 µm de largo. Mientras tanto se preparó una cámara de perfusión añadiendo kinesina para que se pegara a la superficie del vidrio y éste se lavó con tampón para eliminar el exceso de kinesina. A continuación se añadieron 10 µl de microtúbulos estabilizados y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Un nuevo lavado retiró los microtúbulos no unidos a kinesina. En otra cámara preparada de igual manera se añadió el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 (10 µM) a la solución de incubación. Ambas cámaras se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP5) excitando con una longitud de onda de 515 nm y captando la emisión a 590 nm. Se tomaron fotografías cada minuto durante un periodo de 30 minutos, siempre a temperatura ambiente. La velocidad de los microtúbulos se calculó a partir de estas fotografías con el programa ImageJ. Para cada condición se midió la velocidad de 58-84 microtúbulos. La significación estadística se analizó mediante el test de la t de Student. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los microtúbulos en situación control (ausencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2) se deslizaron sobre el césped de kinesinas a una velocidad media de $0,191 \pm 0,009$ µm/min, mientras que en presencia de 10 µM de péptido identificado por la SEQ ID NO: 2, los microtúbulos se deslizaron a una velocidad mayor, a $0,274 \pm 0,006$ µm/min (Figura 7).

En otro experimento, los microtúbulos en ausencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 se deslizaron sobre el césped de kinesinas a una velocidad media de $0,160 \pm 0,009$ µm/min, mientras que en presencia de 10 µM de péptido identificado por la SEQ ID NO: 1, los microtúbulos se deslizaron a una velocidad de $0,285 \pm 0,017$ µm/min (Figura 8).

Ejemplo 5. Comparación de la actividad ATPasa de distintas kinesinas humanas en presencia de los péptidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2

Se prepararon una muestra problema y una muestra control, en cuadruplicado, en distintos pocillos de una placa. En cada pocillo se añadieron 20 µg de microtúbulos estabilizados con taxol 15 µM, 5 µg de una kinesina humana dentro del siguiente grupo: cromokinesina (Fig. 3), CENP-E (Fig. 4) y Eg5 (Fig. 5) y péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 a una concentración 7,7 µM. De igual forma, se añadió péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 a una concentración 10 µM a muestras que contenían Eg5 (Fig. 11), CENP-E (Fig. 12) y cromokinesina (Fig. 13). El control contenía todos los reactivos a las mismas concentraciones excepto el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 6. Comparación de la actividad ATPasa de la kinesina en presencia de péptidos de distintas especies

Se comparó la actividad de la kinesina 1 en presencia del péptido de ratón (*Mus musculus*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 4, el péptido de pollo (*Gallus gallus*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 5 y el péptido de pez (*Fugu rubripes*) identificado por la secuencia SEQ ID NO: 6. Se prepararon 3 muestras y una muestra control, en cuadruplicado, en distintos pocillos de una placa. En cada pocillo se añadieron 20 µg de microtúbulos estabilizados con taxol 15 µM, 1 µg de kinesina 1 humana y 10 µM de los péptidos identificados por las secuencias SEQ ID NO: 2, 4, 5 y 6. El control contenía todos los reactivos a las mismas concentraciones excepto los distintos péptidos. Los resultados (excepto para los datos obtenidos en presencia del péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 6) se muestran en la Fig. 6.

REIVINDICACIONES

1. Péptido capaz de aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos, de fórmula:

5

 $R-X$

(I)

donde:

- X está identificado por la SEQ ID NO: 1,
- R es H o está identificado por la SEQ ID NO: 9.

10

2. Péptido según reivindicación 1, caracterizado por que dicho péptido tiene una homología de secuencia del 95% respecto al péptido de fórmula (I).

3. Péptido según reivindicación 2, caracterizado por que dicha homología de secuencia es del 90%.

4. Péptido según reivindicación 3, caracterizado por que dicha homología de secuencia es del 88%.

5. Péptido según reivindicación 4, caracterizado por que dicha homología de secuencia es del 77%.

15

6. Péptido según reivindicación 5, caracterizado por que dicha homología de secuencia es del 75%.

7. Péptido según reivindicación 6, caracterizado por que dicha homología de secuencia es del 75% y dicho R está identificado por la SEQ ID NO: 10.

8. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la concentración de dicho péptido es entre 1 y 10 μM .

20

9. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que dicha kinesina está aislada de un hongo o una planta.

10. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que dicha kinesina está aislada de un invertebrado.

11. Péptido según reivindicación 10, caracterizado por que dicho invertebrado es un díptero o un cefalópodo.

25

12. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que dicha kinesina está aislada de un vertebrado.

13. Péptido según reivindicación 12, caracterizado por que dicho vertebrado es un humano.

14. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que dicha homóloga funcional de la kinesina está aislada de un organismo procariota.

30

15. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que dichos microtúbulos están aislados de un hongo o una planta.

16. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que dichos microtúbulos están aislados de un invertebrado.

35

17. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que dichos microtúbulos están aislados de un vertebrado.

18. Péptido según reivindicación 17, caracterizado por que dicho vertebrado es un mamífero.

19. Péptido según reivindicación 18, caracterizado por que dicho mamífero está seleccionado entre el grupo compuesto por humano, bovino, porcino, ovino, caprino y equino.

20. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, capaz de aumentar la potencia de dicha kinesina.

40

21. Procedimiento para aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina o su homóloga funcional sobre microtúbulos, que comprende poner en contacto microtúbulos, dicha kinesina, ATP y un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

22. Dispositivo que comprende al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, una kinesina o su homóloga funcional, microtúbulos y ATP sobre un soporte.
23. Dispositivo según reivindicación 22, caracterizado por que dicho soporte es vidrio o SiO₂.
24. Dispositivo según reivindicación 22, caracterizado por que dicho dispositivo es un biosensor.
- 5 25. Dispositivo según una de las reivindicaciones 22 ó 23, caracterizado por que dicho dispositivo es un dispositivo de transporte de moléculas.
26. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, caracterizado por que dicha kinesina está aislada de un hongo o una planta.
- 10 27. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, caracterizado por que dicha kinesina está aislada de un invertebrado.
28. Dispositivo según reivindicación 27, caracterizado por que dicho invertebrado es un díptero o un cefalópodo.
29. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, caracterizado por que dicha kinesina está aislada de un vertebrado.
30. Dispositivo según reivindicación 29, caracterizado por que dicho vertebrado es un humano.
- 15 31. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, caracterizado por que dicha homóloga funcional de la kinesina está aislada de un organismo procariota.
32. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 31, caracterizado por que dichos microtúbulos están aislados de un hongo o una planta.
- 20 33. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 31, caracterizado por que dichos microtúbulos están aislados de un invertebrado.
34. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 31, caracterizado por que dichos microtúbulos están aislados de un vertebrado.
35. Dispositivo según reivindicación 34, caracterizado por que dicho vertebrado es un mamífero.
- 25 36. Dispositivo según reivindicación 35, caracterizado por que dicho mamífero está seleccionado entre el grupo compuesto por humano, bovino, porcino, ovino, caprino y equino.

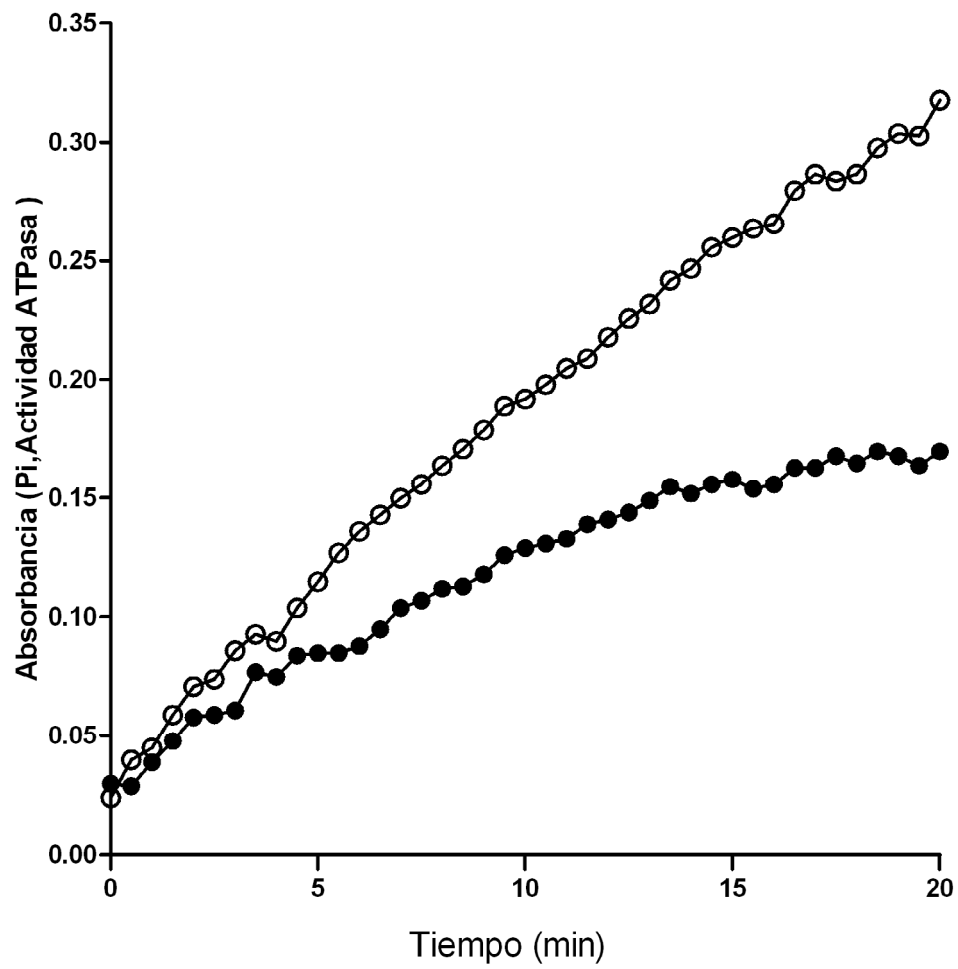


FIG. 1

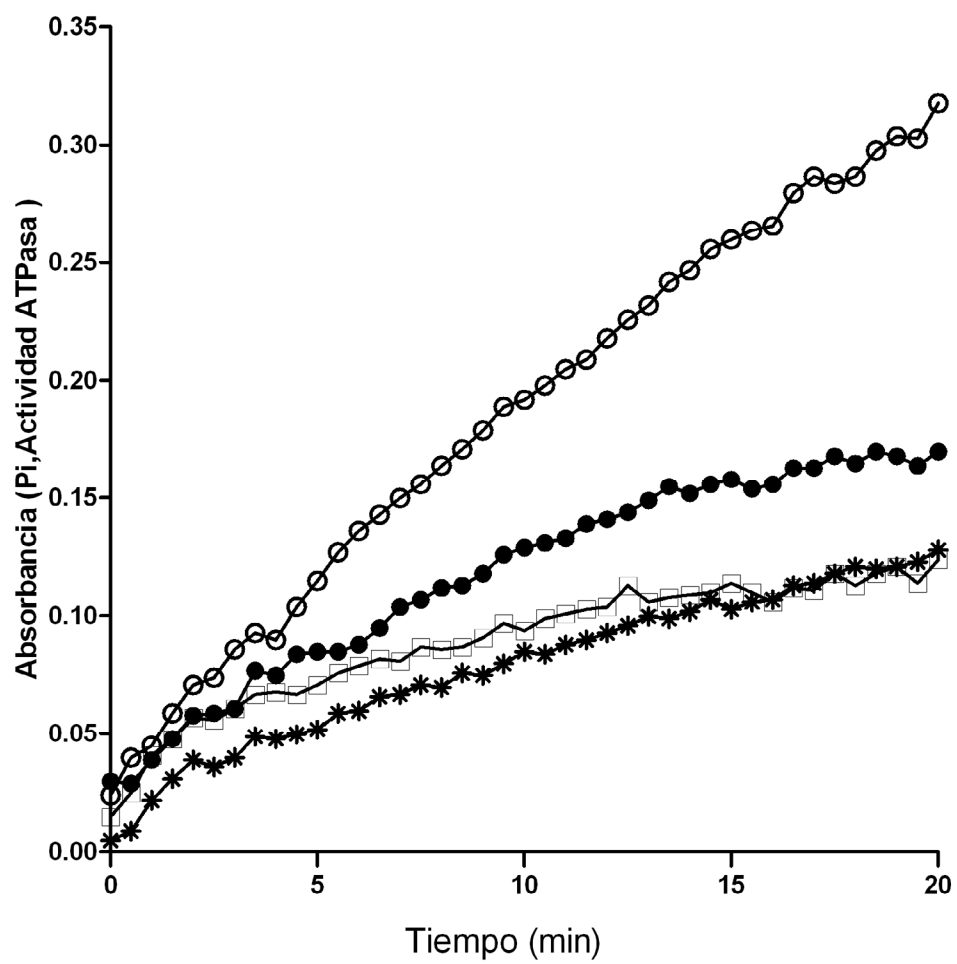


FIG. 2

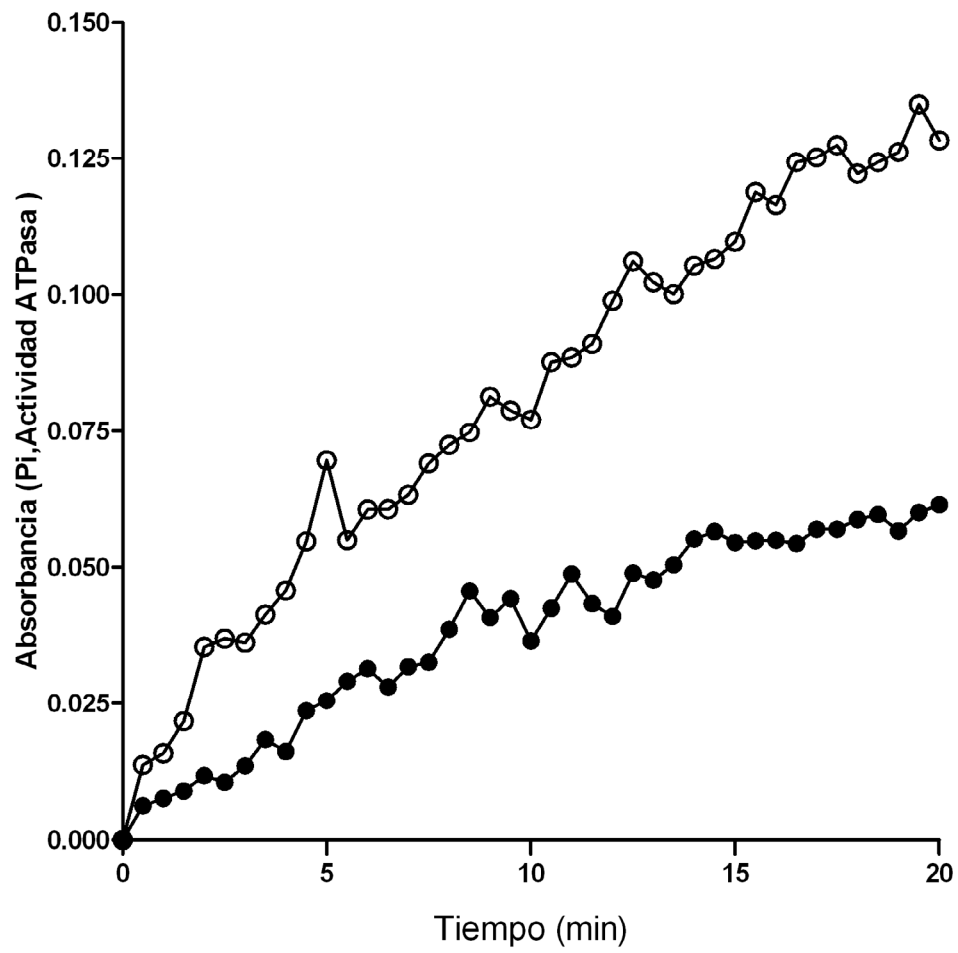


FIG. 3

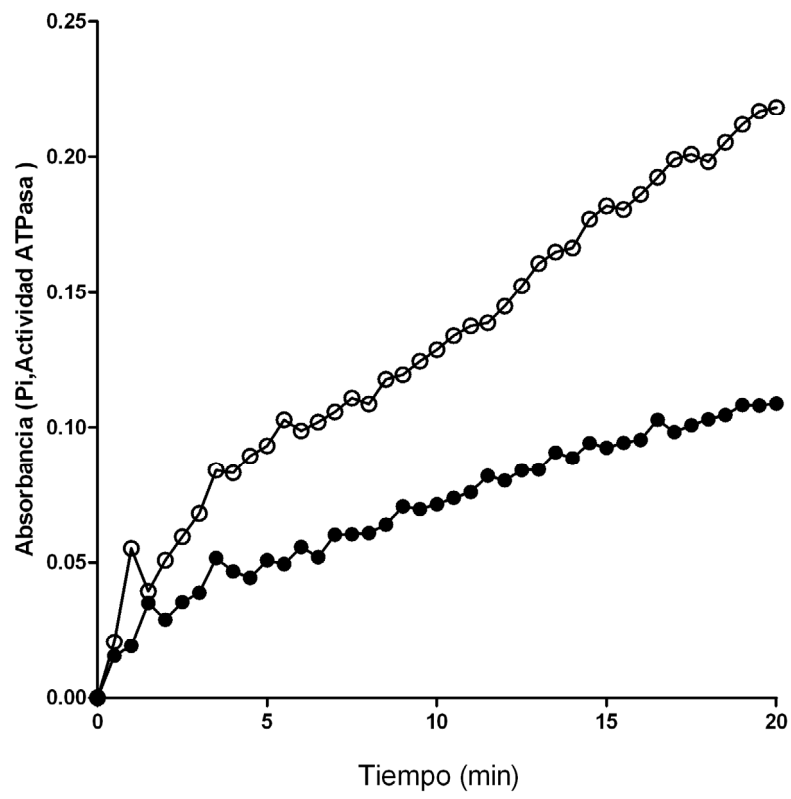


FIG. 4

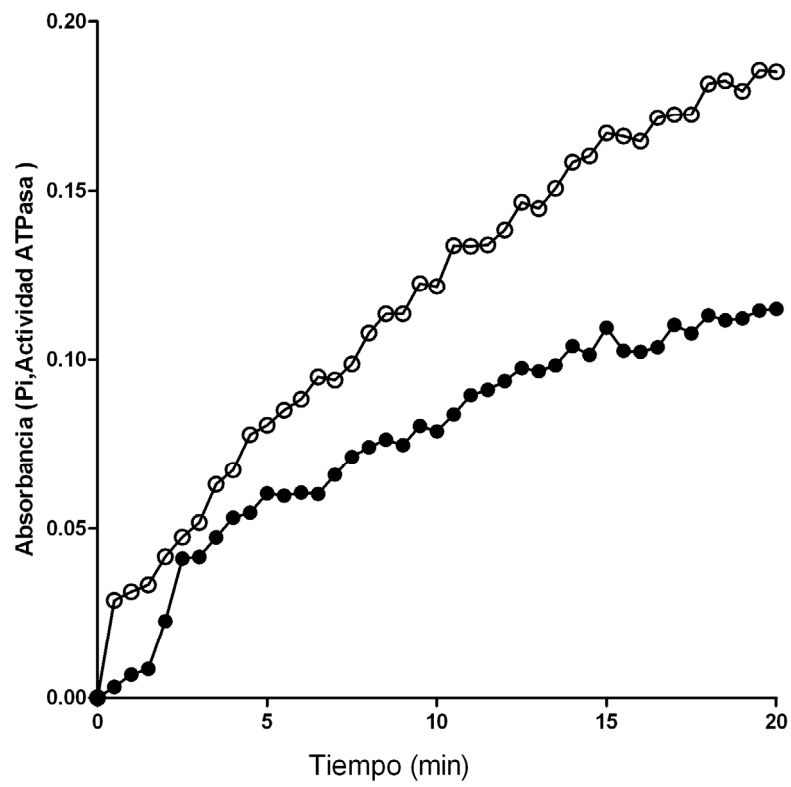


FIG. 5

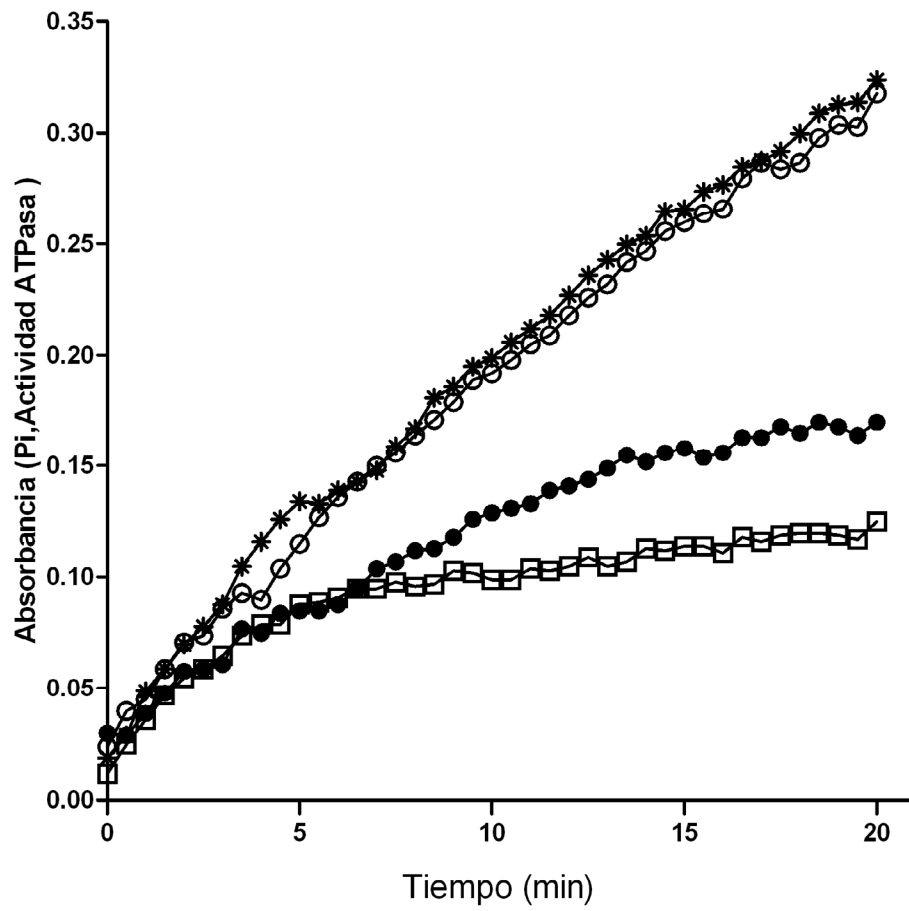


FIG. 6

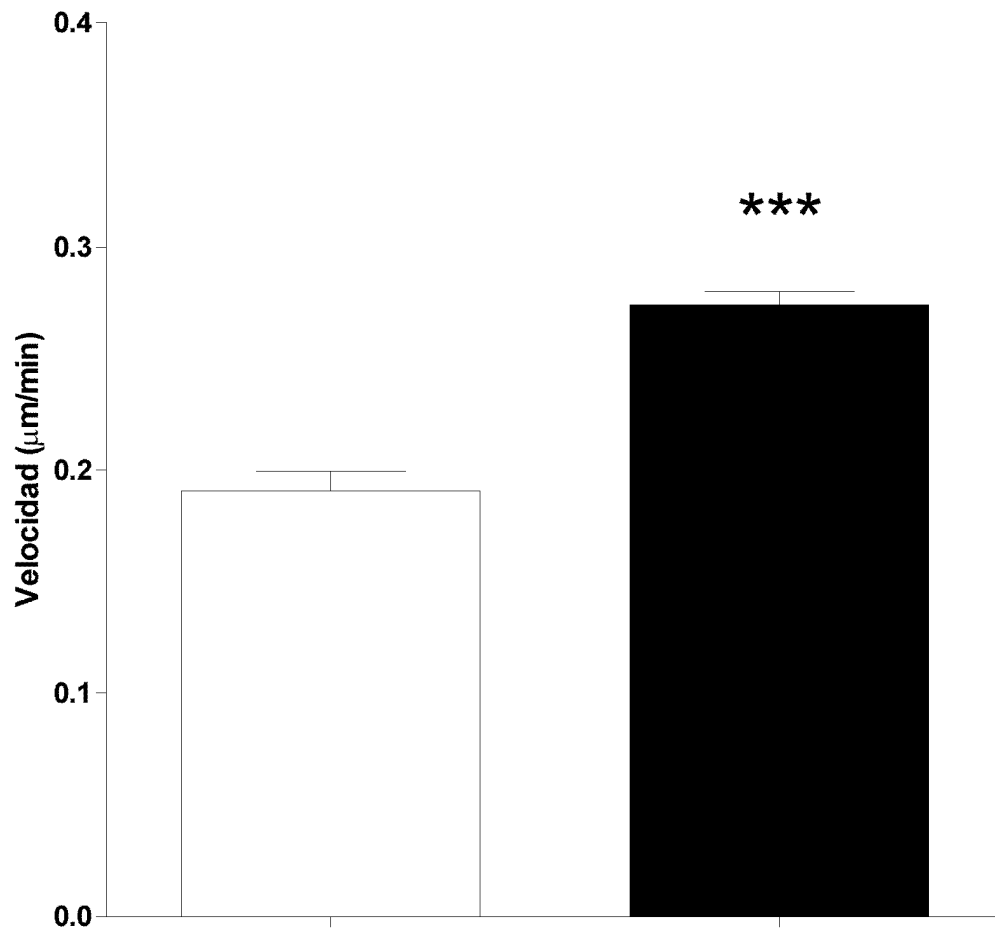


FIG. 7

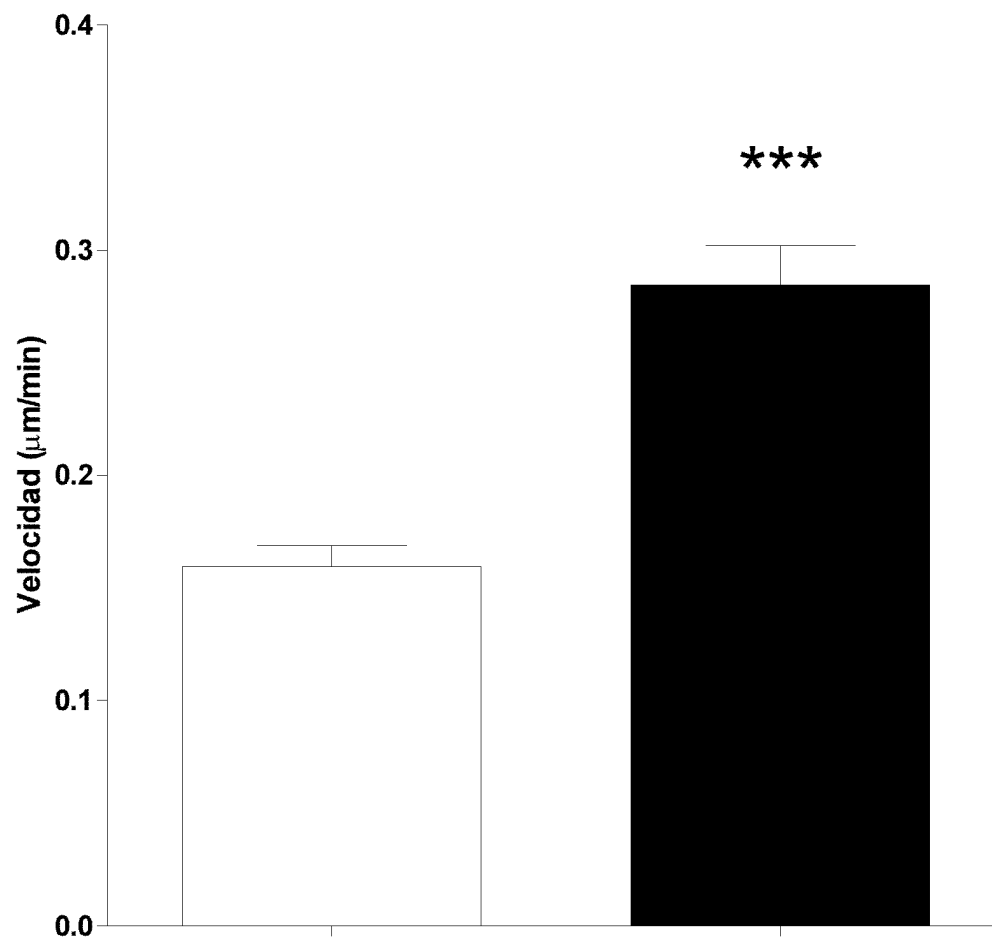


FIG. 8

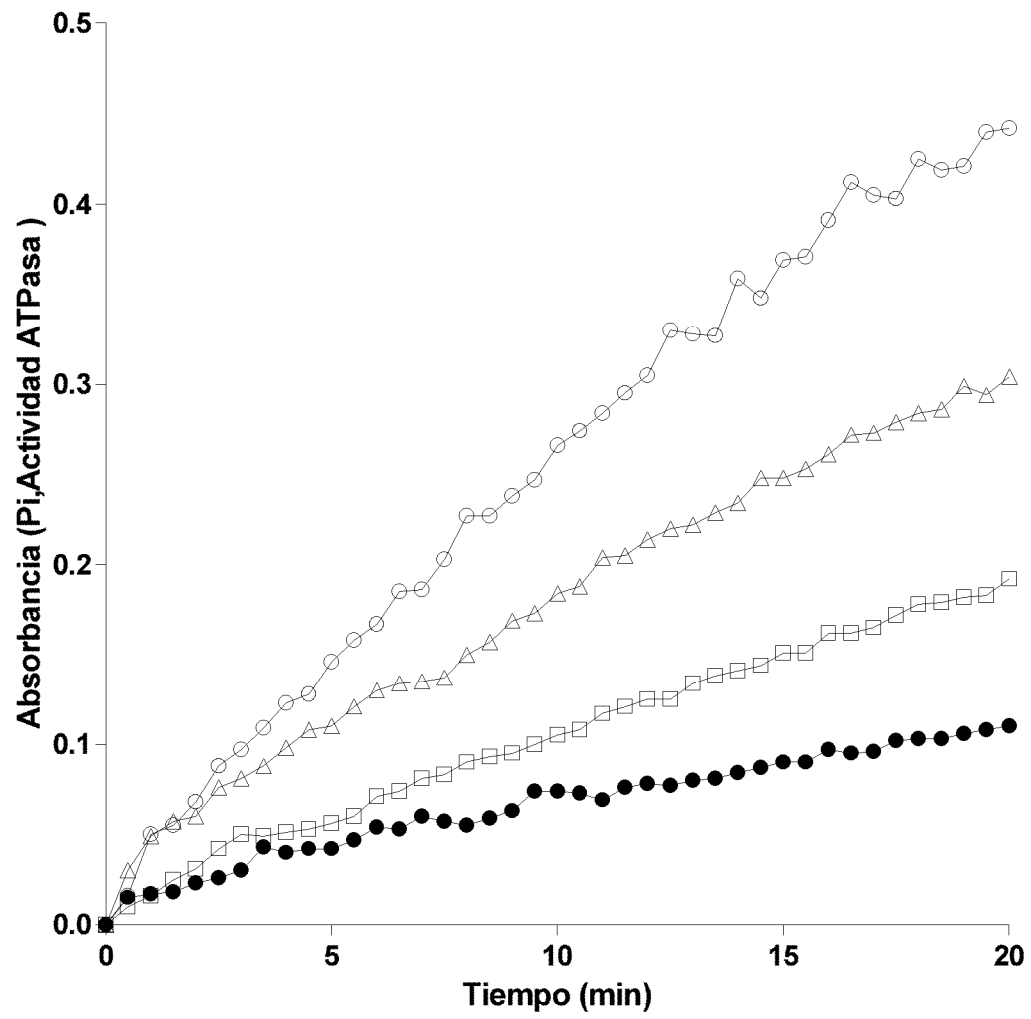


FIG. 9

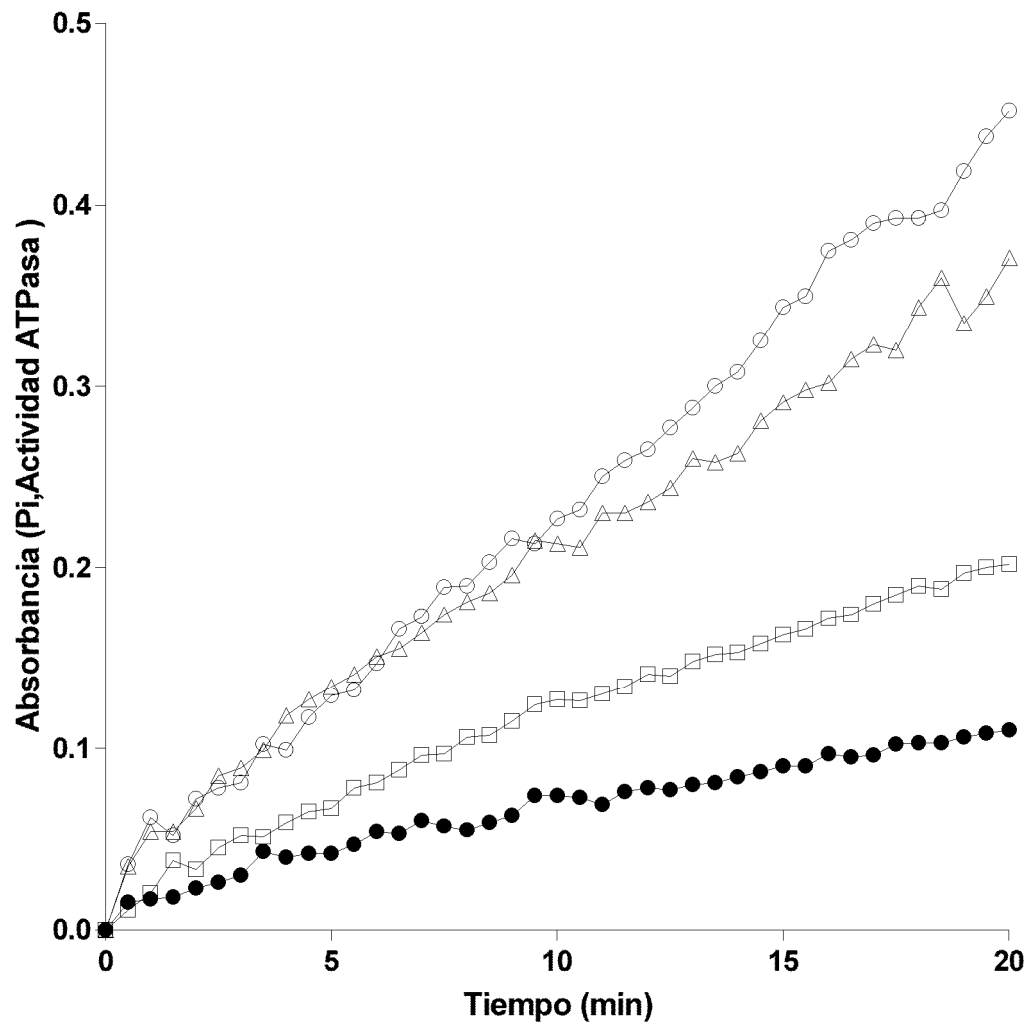


FIG. 10

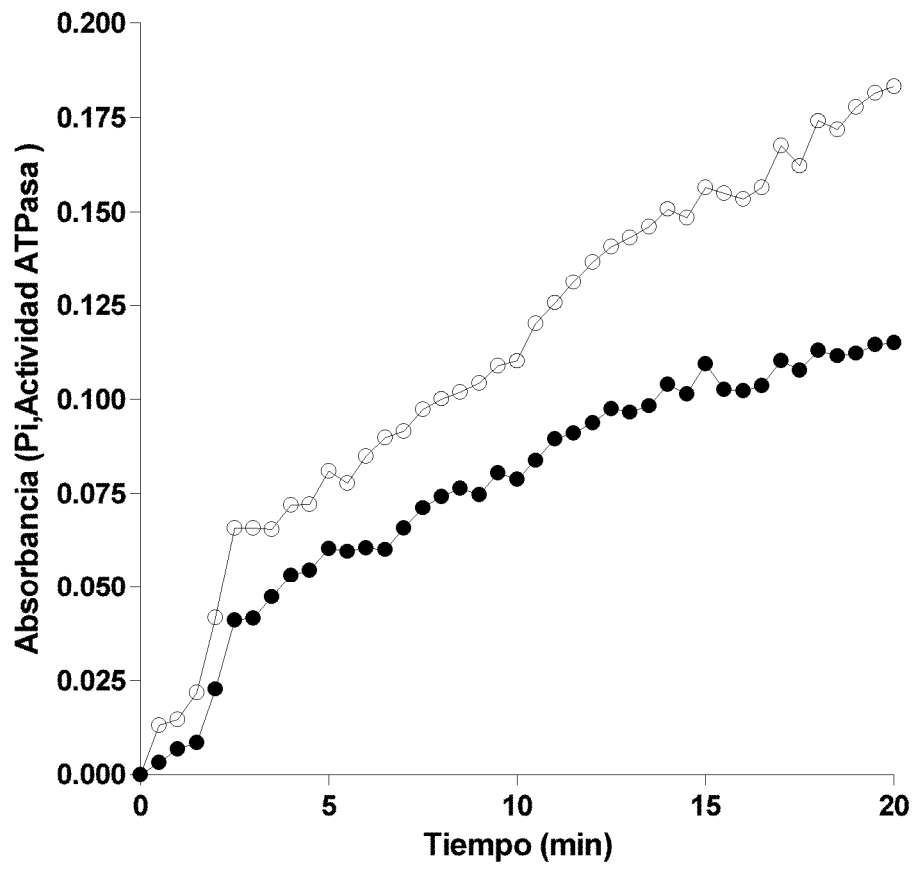


FIG. 11

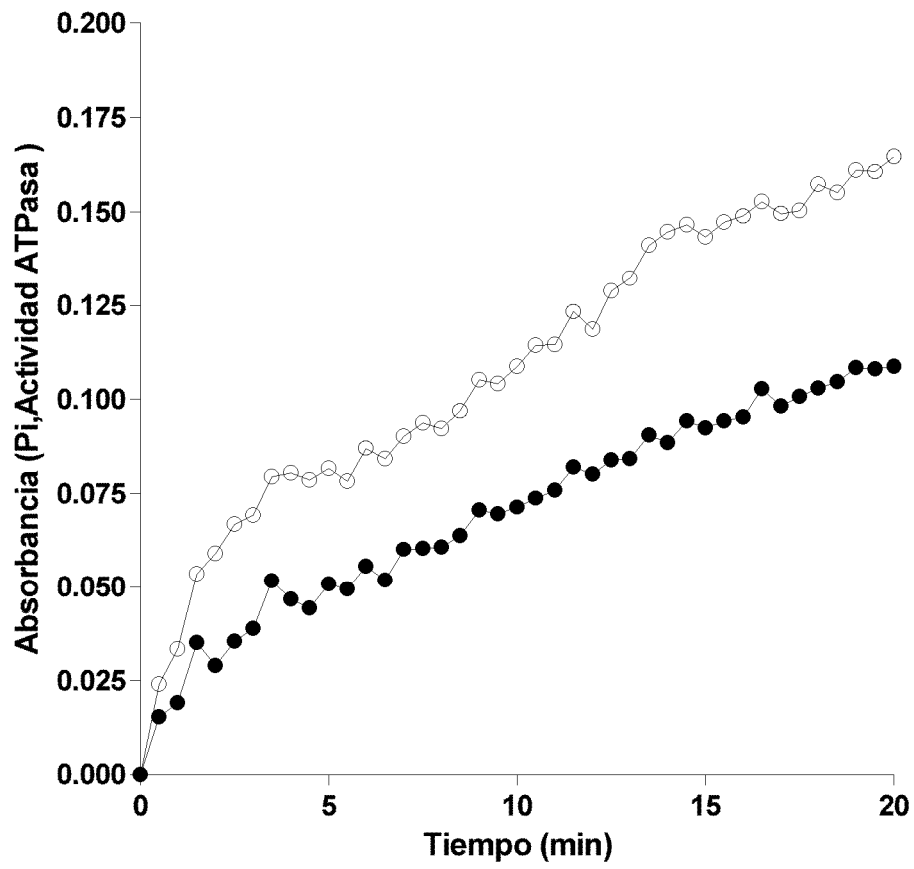


FIG. 12

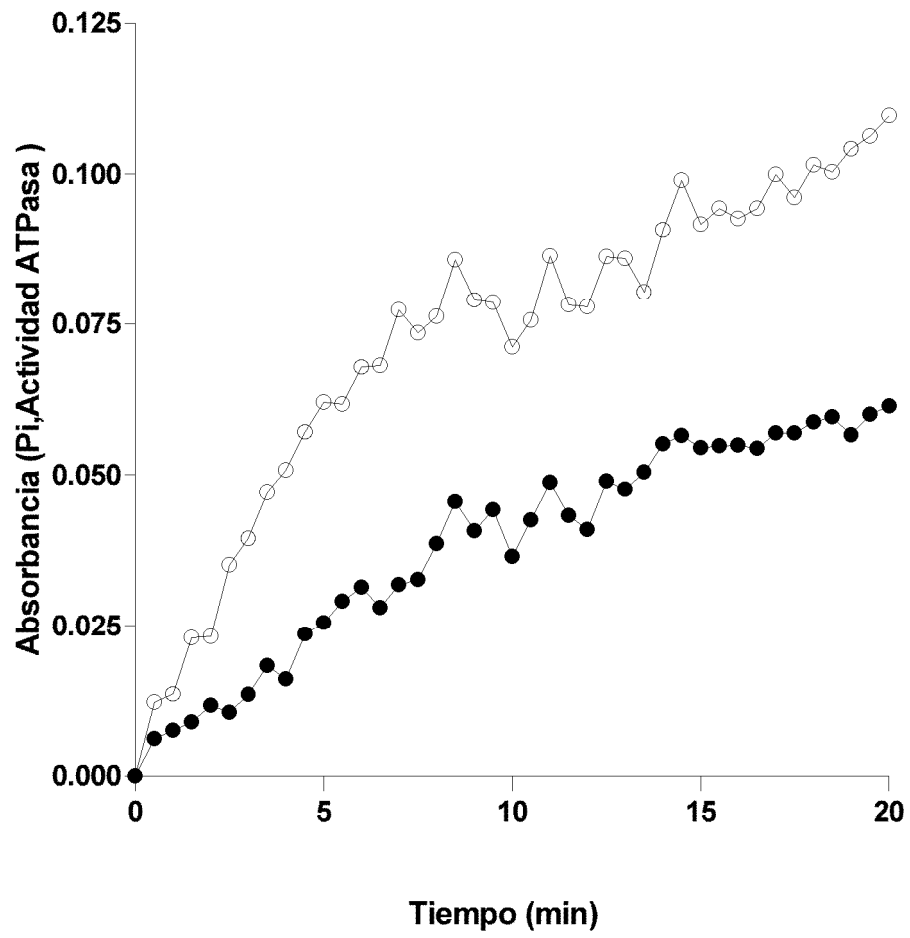


FIG. 13



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130116

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.01.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K14/575** (2006.01)
G01N33/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MARTINEZ, A. et al. "Proadrenomedullin NH2-terminal20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumorgrowth". CANCER RESEARCH. 15.09.2004. Vol.64, nº 18, páginas 6489-6494. Resumen.	1-20
X	MARTINEZ, A. et al. "Molecular evolution of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP): evidence for gene co-option". ENDOCRINOLOGY. 01.07.2006. Vol. 147, nº 7, páginas 3457-3461. Todo el documento especialmente tabla 1, péptidos P1 y P4.	1-20
X	EP 0622458 A2 (SHIONOGI & CO., LTD.) 02.11.1994, todo el documento especialmente reivindicaciones 19, 20.	1-20
A	CHO, K. et al. "RANBP2 is an allosteric activator of the conventional kinesin-1 motor protein, KIF5B, in a minimal cell-free system". EMBO REPORTS. Mayo 2009. Vol. 10, N.º. 5, páginas 480 - 486; todo el documento.	1-36

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.08.2012

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.08.2012

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 21-36

SI

Reivindicaciones 1-20

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 21-36

SI

Reivindicaciones 1-20

NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en péptidos relacionados con la adrenomedulina y su uso para aumentar la velocidad de desplazamiento de una kinesina sobre microtúbulos. La invención también incluye el dispositivo para llevar a cabo el ensayo.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MARTINEZ, A. et al. "Proadrenomedullin NH2-terminal20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumorgrowth". CANCER RESEARCH. 15.09.2004. Vol.64, nº 18, páginas 6489-6494.	
D02	MARTINEZ, A. et al. "Molecular evolution of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP): evidence for gene co-option". ENDOCRINOLOGY. 01.07.2006. Vol. 147, nº 7, páginas 3457-3461.	
D03	EP 0622458 A2 (SHIONOGI & CO., LTD.)	02.11.1994
D04	CHO, K. et. al. "RANBP2 is an allosteric activator of the conventional kinesin-1 motor protein, KIF5B, in a minimal cell-free system". EMBORREPORTS. Mayo 2009. Vol. 10, N°. 5, páginas 480 - 486.	

El documento D01, describe la actividad del péptido PAMP como factor angiogénico y demuestra que su inhibición se traduce en una reducción en el crecimiento de células tumorales.

El documento D02, analiza las secuencias homólogas de los péptidos PAMP de varias especies y cómo se traducen las variaciones filogenéticas de las secuencias, en su actividad funcional.

El documento D03, describe la adrenomedulina y varios péptidos derivado y/o relacionados con la misma; entre éstos, se describen el péptido PAMP y el péptido que en la presente solicitud se presenta como SEQ ID nº 1.

El documento D04, describe la proteína RANBP2 como activador de la actividad ATPasa de la kinesina KIF5B, en presencia de microtúbulos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA****Reivindicaciones 1-20**

Los péptidos reivindicados en las reivindicaciones 1-20, han sido descritos previamente en el estado de la técnica. Los documentos D01-D03, describen dichos péptidos y por tanto, las reivindicaciones 1-20 no cumplen los requisitos de los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986 en relación a la novedad y actividad inventiva. Dichas reivindicaciones deberían adecuarse en su redacción, a reivindicaciones de uso.

Reivindicaciones 21-36

No se ha descrito anteriormente en el estado de la técnica, que los péptidos de las reivindicaciones 1-20 actúen como activadores del desplazamiento de las kinesinas sobre microtúbulos. Las reivindicaciones 21-36, cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.