



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE Nº

03-27159

54 TITULO PROCESO INDUSTRIAL QUE POSEE UNA ACTIVIDAD ECONOMICA Y ANTIDROGUELA

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

C 07 K 14/00

71 SOLICITANTE COMISION PARA INVESTIGACIONES DROGUELAS

DOMICILIO Bogotá, Colombia

74 APODERADO Ernesto Cavalier Franco

22 BOGOTA, D C 1 de Abril de 2003

20037

NE

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

13 027159 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 03067159 00000000

Folios: 41

Fecha (MM): 2003-04-01 16:28:09

Trámite: 1 002 PATENTES D 1 REGISTRAR/ 411 PRESENTAR
Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.

SOLICITANTE
(71)

Nombre: Corporación para Investigaciones
Biológicas.

Dirección: Carrera 72 A No. 78 B-1411

Teléfono: 4410855 Fax: 4415514

E-mail:

Domicilio: Medellín, Colombia

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NT



C.E.



Otro



Número: 890.908.790-8

**REPRESENTANTE
O APODERADO**
(74)

Nombre: Ernesto Cavalier Franco

Dirección: Carrera 9 No. 74-08 Of. 504

Teléfono: 376 4200 Fax: 376 1707

E-mail: ernesto.cavalieraprc-laws.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NT



C.E.



Otro



Número: 19.081.620 TP11519

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Ver Anexo

Dirección:

Teléfono:

Fax:

E-mail:

Domicilio

IDENTIFICACIÓN

C.C.



Otro



C.E.



Número

5

Título (54)

PEPTIDO SINTETICO QUE POSEE UNA ACTIVIDAD TONORFICA Y ANTIMICROBIANA

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/00

7

Prioridad

SI ☐

NO ☒

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

8

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

6 meses ☐

12 meses ☐

18 meses ☒

Otro ☐

9

Comprobante de pago No. 18371 por \$5.000.000

Fecha Mayo 13/03

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

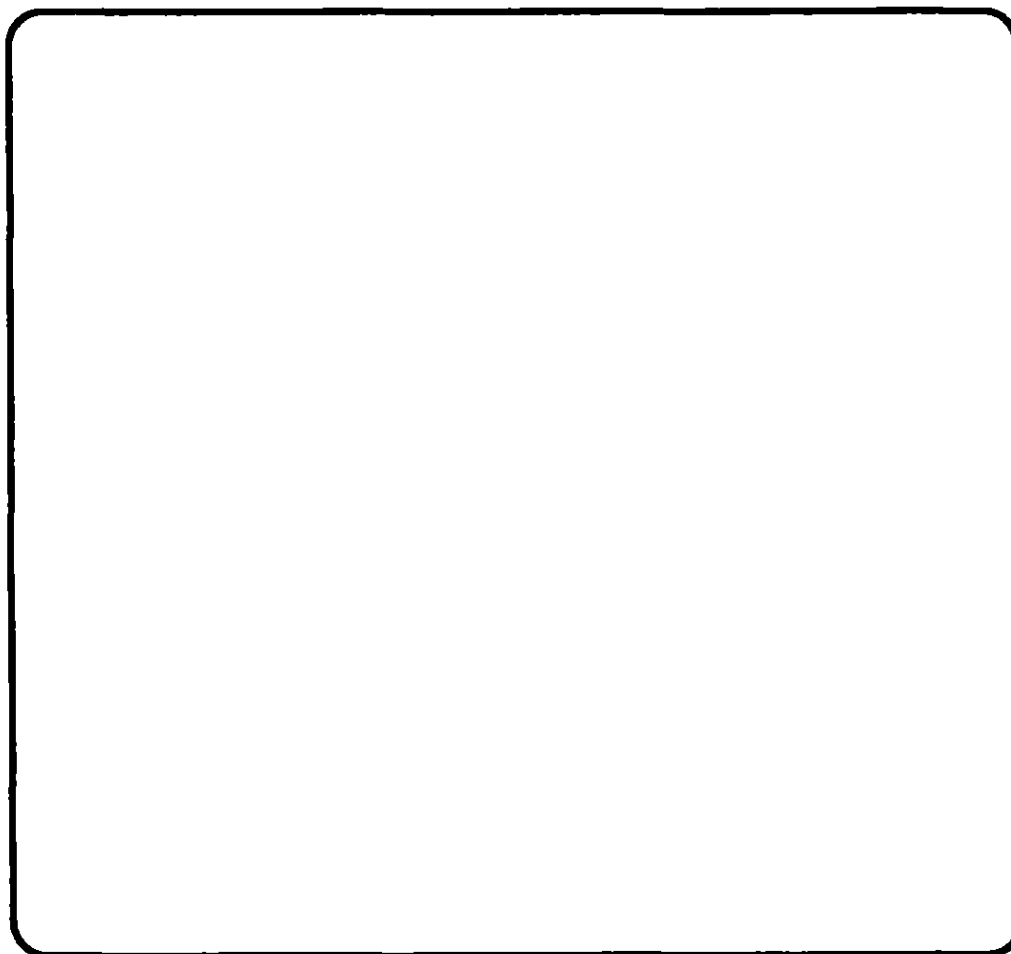
10

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 por reivindicación de prioridad.
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ 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 las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

NOMBRE

FIRMA

CÓDIGO DE BARRAS: 1519

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

ANEXO INVENTORES

LEMESHKO V., domiciliado en Medellín, Colombia; ORDUZ S., domiciliado en Medellín, Colombia; SEGURA C., domiciliado en Medellín, Colombia; GUZMÁN F., domiciliado en Bogotá, Colombia; y PATARROYO M.E., domiciliado en Bogotá, Colombia.

LEMESHKO VÍCTOR

ORDUZ SERGIO

SEGURA CESAR

GUZMÁN FANNY

PATARROYO MANUEL ELKIN .

**PEPTIDO SINTÉTICO QUE POSEE UNA ACTIVIDAD IONOFÓRICA Y
ANTIMICROBIANA**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Esta invención proporciona un novedoso péptido (P1) de 26 aminoácidos sintético que inhibe el crecimiento de microbios. El péptido P1 también muestra actividad ionofórica en las mitocondrias de hígado de rata. Esta invención además proporciona composiciones farmacéuticas y composiciones de uso agrícola que contienen el péptido de la invención.

**PEPTIDO SINTETICO QUE POSEE UNA ACTIVIDAD IONOFÓRICA Y
ANTIMICROBIANA**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con el campo de los péptidos antimicrobianos e ionoforos. Más específicamente, se proporciona un péptido sintético, que inhibe el crecimiento de microbios. Este péptido también muestra actividad ionofórica en las mitocondrias de hígado de rata. Además, también se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen el péptido de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los péptidos catiónicos antimicrobianos son candidatos promisorios, así como nuevos antibióticos potenciales, de utilidad clínica; estos péptidos son producidos por organismos tanto procarióticos como eucarióticos (Saberwal G., Nagaraj R. 1994. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochim. Biophys. Acta.* 1197: 109-131; 1. Boman H.G. 1995. Peptide antibiotics and their Role in innate immunity. *Annu. Rev.*

Immunol. 13: 61-92; Nicolas P., Mor A. (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.* 4: 277-304; y Maloy W.L., Kari U. P. 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* 37: 105-122). Se sabe que ellos son un componente esencial del sistema de defensa de vertebrados e invertebrados, destinados a controlar la proliferación celular y la invasión por patógenos en órganos y tejidos (Ganz T. 2002. Antimicrobial peptides in host defense of the respiratory track. *J. Clin. Inv.* 109: 693-697). Por su potencial terapéutico estos antibióticos naturales han sido objeto de muchos estudios en años recientes (Hancock R.E.W. and Chapple D. 1999. Peptides antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317-1323). La actividad antimicrobiana de los péptidos catiónicos ha sido principalmente atribuida a la perturbación de la membrana citoplásmica o a su función efectora en la inmunidad natural. La estructura tridimensional de estos péptidos es altamente conservada a pesar de que estructura primaria es muy heteróloga (Maloy y Kari 1995, Artículo citado; Hancock R.E.W. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet infectious diseases.* 1: 156-164.). Estos péptidos se plegan, ya sea formando puentes disulfuro o mediante el contacto con los lípidos de las membranas biológicas (Bernheimer A.W. 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 864: 123-141.), en una estructura tridimensional anfifílica en la cual las cargas positivas y el dominio hidrofílico se separan del dominio hidrofóbico (Hancock,

2001, Artículo citado) llevando a la formación de poros de selectividad variable sobre las membranas de las bacterias o células eucarióticas. El daño de la membrana plasmática en muchos casos resulta en lisis celular. Ejemplos de estos daños estan en las patentes Nos. 4,355,104 (Oct., 1982) y 4,520,016 (May, 1985) de Hultmark y col., quienes describen las propiedades bacteriolíticas de algunas cecropinas contra bacterias Gram-negativas. Muy interesante es que las cecropinas descritas en las patentes anteriores de Hultmark y col., no son universalmente efectivas contra todas las bacterias Gram-negativas. Por ejemplo, las cecropinas descritas lisan la bacteria *Serratia marcescens* de la cepa D61108, pero no *Serratia marcescens* de la cepa D611. Más aun, se ha informado que las cecropinas no tienen actividad lítica contra células eucarióticas tales como células de insectos, de hígado y eritrocitos de carnero, como aparece en las patentes de Hultmark y Zasloff U.S. Pat. No. 4,810,777 (Mar, 1989); y en Steiner y col., (Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H.G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 292: 246-248), Andreu y col., (Andreu D., Merrifield R.B., Steiner H., Boman H.G. 1985. N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. *Biochemistry*. 24: 1683-1688.) y Boman y col., (Boman H.G., Faye I., von Hofsten P., Kockum K., Lee J.Y., Xanthopoulos K.G., Bennich H., Engstrom A., Merrifield R.B., Andreu D. 1985. On the primary structures of lysozyme, cecropins and attacins from *Hyalophora cecropia*. *Dev. Comp. Immunol*. 9: 551-558.). Mas recientemente un grupo

de péptidos antimicrobianos producidos en los tejidos los humanos y conocidos como defensinas han sido informados en las patentes de Barra, y col., Pat No. 6,310,176 (Oct, 2001), y Olsen y col., Pat No. 6,420,116 (Jul, 2002). Otros péptidos con las mismas propiedades son producidos naturalmente en el sistema inmunológico de los insectos *Sarcophaga peregrina* y *Bombyx mori*, como fueron informados por Nakajima y col. (Nakajima Y., Qu X.M., Natori S. 1987. Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biol. Chem.* 262: 1665-9). Las diferencias en la actividad bacteriolítica de los péptidos antimicrobianos han sido atribuidas a las diferencias en la composición de las membranas plasmáticas de las células (Bernheimer, 1986, Artículo citado). Por tanto, no es sorprendente que los péptidos menos específicos tales como las cecropinas tengan mas capacidad de lisar células procarióticas que las células eucarióticas del insecto.

RESUMEN DE LA INVENCION

En una primera realización, la presente invencion proporciona un nuevo péptido, con la siguiente secuencia de aminoácidos:

VAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS y sales o derivados
farmacéuticamente aceptables del mismo.

Este nuevo péptido sintético es de naturaleza catiónica. Este péptido de 26 aminoácidos de longitud, denominado P1, puede matar bacterias por contacto con ellas. El péptido de esta

invención también induce una alta permeabilidad de la membrana interna mitocondrial para potasio e iones de hidrogeno, causando un hinchamiento dramático de la mitocondria incubada en los medios isotónicos KNO_3 y NH_4NO_3 , respectivamente, a concentraciones micromolares del péptido comparables a las concentraciones efectivas de valinomicina (un ionoforó clásico para potasio) y el carbonil-cianido-p-trifluorometoxi fenilhidrazona (FCCP, un protonóforo clásico). En la mitocondria la actividad ionofórica del péptido es selectiva para cationes, con el siguiente orden de selectividad: $\text{H}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Tris}^+$. La actividad ionofórica de P1 sugiere que este péptido podría ser un potencial antibiótico. La estructura de P1 en un ambiente hidrofóbico es una hélice-alfa lo que esta en concordancia con la idea que el péptido puede formar canales iónicos en las membranas biológicas. La actividad hemolítica del péptido P1 es altamente susceptible a la composición del medio de incubación. En una solución fisiológica, su actividad hemolítica disminuye significativamente con el incremento del hematocrito y se observo que es despreciable a un hematocrito alto.

El péptido de la presente invención es útil en la inhibición del crecimiento de microbios, así mismo, dicho péptido muestra una actividad ionofórica en las mitocondrias. En particular, el péptido de la presente invención presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Igualmente, dicho péptido presenta actividad ionofórica en la membrana interna de la mitocondria del hígado de rata.

La presente invención también proporciona el uso del peptido en la manufactura de un medicamento o composición farmacéutica que tiene actividad antimicrobiana.

En una segunda realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo el peptido de la presente invención junto con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una tercera realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo el peptido de la presente invención en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento microbiano, junto con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una cuarta realización, la composición farmacéutica de la presente invención se presenta en una forma adecuada para administración, oral, rectal, o parenteral.

La presente invención también proporciona, como una quinta realización, el uso del peptido en la manufactura de una composición para uso agrícola.

En una sexta realización, la presente invención proporciona una composición para uso agrícola que comprende como ingrediente activo el peptido de la presente invención junto con un portador o vehículo aceptable.

11
8

En una séptima realización, la presente invención pr porciona una composición para uso agrícola que comprende como ingrediente activo el peptido de la presente invención en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento microbiano, junto con un portador o vehículo aceptable.

En una octava realización, la composición para uso agrícola de la presente invención se presenta en una forma adecuada para su aplicación agrícola.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIGURA 1 *Actividad Ionofórica de P1 en la membrana interna de la mitocondria de hígado de rata.* Las mitocondria a la concentración de 0.5 mg/ml de proteína fueron incubadas en los medios 125 mM KNO₃, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (Panel A) y 125 mM NH₄NO₃, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (Panel B), ambos medios fueron suplementados con 2.5 µM rotenona y 1 µM oligomicina (RO), adicionados justo después de las mitocondrias. El peptido P1 se adicionó a las siguientes concentraciones finales: 1.8 µM P1 (curvas a); 0.36 µM P1 (curvas b); 0.18 µM P1 (curvas c); 0.18 µM P1 mas 2.5 µM succinato (curvas d); 0.12 µM valinomicina (curva e), y 2µM FCCP, (curva f). En el Panel C, se evalua la permeabilidad inducida por el péptido en la membrana interna mitocondrial para los siguientes cationes: H⁺, K⁺, Na⁺, and Tris⁺. Por la adición de 0.18 µM de P1 a las mitocondrias mas RO en los siguientes medios,

respectivamente: 125 mM NH_4NO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (curva a); 125 mM KNO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4, (curva b); 125 mM NaNO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4, (curva c); and 125 mM Tris-HCl, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4, (curva d). No se observo actividad ionofórica cuando otros péptidos derivados de diferentes partes de la misma proteína se usaron en las mitocondria en el medio 125 mM NH_4NO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (péptidos P9, P10 y P11) (Figura 1, Panel D).

FIGURA 2. La actividad ionofórica de P1 en la membrana interna de la mitocondria de hígado de rata es susceptible a proteasas; En este ensayo, 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial se incubó con RO y 1.8 μM de P1 durante diferentes intervalos de tiempo: 2.5 min (curva a); 10 min (curva b); 20 min (curva c), entonces nuevas mitocondrias frescas (0.5 mg/ml) se re-adicionaron (Panel A). El efecto ionofórico de P1 desapareció cuando P1 fue previamente tratado con tripsina (B) así: (1.8 μM) de P1 y 10 μg de tripsina se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, entonces 0.5 mg/ml de mitocondrias se adicionaron (curva +T), el péptido sin tratamiento con tripsina se indica (curva -T, P1).

FIGURA 3 Espectro de dicroísmo circular de P1 en un medio hidrofóbico; la figura muestra que la mayor parte del péptido adopta una conformación helicoidal en un medio de hidrofobicidad creciente (en concentraciones crecientes de trifluoroetanol, TFE). Los porcentajes de estructura alfa hélice del péptido P1 se muestran en la tabla 3.

10
13

FIGURA 4 Espectro de dicroísmo circular del péptido P1 en membranas artificiales. Los liposomas se prepararon como se describe en materiales y métodos. La figura muestra que el péptido P1 puede adoptar una conformación helicoidal en el medio hidrofóbico de una membrana artificial compuesta de fosfolípidos y colesterol

FIGURA 5 Efecto de P1 en glóbulos rojos humanos; Los glóbulos rojos humanos se resuspendieron a un hematocrito del 0.5% en las soluciones isotónicas indicadas en materiales y métodos. El péptido P1 a diferentes concentraciones se adicionó a la suspensión celular por 1 hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación de la suspensión a 10000 rpm for 5 min a 4°C (Internacional Equipment Company IEC, Centra MP4R; rotor 851), la absorbancia de los sobrenadantes se registró a 415 nm con un espectrofotometro (BIORAD). Los resultados se expresaron como porcentaje relativo a la hemólisis máxima (eritrocitos hemolisados en 0.01% Tween-20).

FIGURA 6 La hemólisis ocasionada por P1 en los eritrocitos decrece con incrementos en el hematocrito; Glóbulos rojos humanos se resuspendieron a diferentes hematocritos: 0.5%, 2.5% y 10 % en 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Glucosa, 10 mM HEPES-tris, pH 7.4. El péptido P1 se adicionó a diferentes concentraciones en la suspensión celular durante 1 h a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 10000 rpm por 5 min a 4°C (Internaci nal Equipment Company IEC, Centra MP4R; rotor 851), y la

H
14

absorbancia a 415 nm se determinó con un espectrofotómetro BIORAD. Los resultados se expresan como porcentaje del máximo de hemólisis (eritrocitos lisados en 0.01% Tween-20).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El péptido sintético P1 de la presente invención, esta compuesto de 26 aminoácidos. La existencia natural de este péptido en bacterias y animales no ha sido reportada en la literatura. Los datos aquí proveídos indican que el péptido P1 es un nuevo factor bactericida. Por su probada actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, junto con su actividad ionofórica en la mitocondria, el péptido P1 se constituye en un péptido antimicrobiano, teniendo en cuenta que el término "antimicrobiano" como se usa aquí significa que el péptido de la presente invención puede inhibir, prevenir, o destruir el crecimiento o proliferación de los microorganismos aquí presentados y otros.

El término "contacto" mencionado en la sección de ensayos antimicrobianos hace referencia a la exposición de la bacteria al péptido de manera que el péptido efectivamente permeabilice la membrana externa de las bacterias gram-negativas y gram-positivas, matándolas. El contacto puede ser *in vitro*, por ejemplo por la adición del péptido a un cultivo bacteriano para probar la susceptibilidad de la bacteria al péptido. Ejemplos de bacterias que pueden matarse o su

crecimiento ser inhibido mediante el péptido P1 incluyen: *E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *B. fragilis* y *C. perfringens* entre otros.

El péptido P1 tiene un character anfipático el cual le permite formar una estructura helicoidal cuando se une al ambiente hidrofóbico de las membranas biológicas. La carga catiónica (positiva) del péptido P1 está determinada por los aminoácidos localizados en las posiciones 6, 14, 18, 23 y 25 por tanto el total de cargas positivas es "de mas cinco" (+5). Los residuos de aminoácidos 6, 10, 14, 18, 19, 23, 25 y 26 son hidrofílicos, mientras los residuos de aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 24 son todos residuos hidrofóbicos.

De acuerdo con los datos arriba presentados, el péptido designado P1 puede contactar células bacterianas matándolas por un incremento en la permeabilidad de su membrana plasmática. Las células incluyen tanto microorganismos gram-positivos y gram-negativos. El péptido P1 tiene 26 aminoácidos, al menos una porción podría alinearse en una conformación de alfa hélice. El péptido tiene una cabeza substancialmente hidrofílica con una carga positiva y una c la substancialmente hidrofóbica. El péptido puede adoptar la conformación de alfa-hélice en un medio de hidrofobicidad creciente (incrementos en el porcentaje de TFE) y en un medio hidrofóbico de una membrana artificial. La conformación puede tener una cara predominantemente hidrofóbica a lo largo de la estructura helicoidal e hidrofílica en la puesta. El péptido

revela una actividad ionofora en la mitocondria de hígado de rata. Esta actividad fue comparable a la de la valinomicina, un antibiótico selectivo para K^+ usado en muchos estudios, y FCCP (uno de los protonóforos clásicos).

Con respecto a la expresión "derivados del mismo", es bien sabido en el área técnica a la cual pertenece la presente invención que pueden llevarse a cabo substituciones menores de amino ácidos al péptido que no afecta o no afectan sustancialmente la función del péptido. Tales substituciones pueden ser llevadas a cabo mediante procedimientos bien conocidos por las personas versadas en la materia. Así, todos los péptidos que tengan sustancialmente la misma secuencia de amino ácidos y sustancialmente la misma actividad antimicrobiana o ionofórica, están dentro del alcance de esta invención.

También dentro del alcance de la presente invención están las sales farmacéuticamente aceptables del péptido de esta invención. Tales sales son formadas por métodos bien conocidos por las personas versadas en la materia. Así, cuando en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones se emplee el término péptido se pretende indicar que el mismo también incluye tanto los derivados como las sales farmacéuticamente aceptables del péptido.

Así mismo, el péptido de la presente invención puede ser formulado para su uso en medicina humana o veterinaria para el uso profiláctico o terapéutico. Las composiciones

14
17

farmacéuticas que incluyen el péptido de la presente invención pueden ser administradas oralmente, rectalmente o parenteralmente, eligiendo en cada caso los vehículos portadores farmacéuticamente aceptables más adecuados dependiendo de la forma de dosificación elegida. La administración puede ser también en la forma de aplicación tópica.

De igual manera, el péptido de la presente invención puede ser formulado para su uso en la agricultura. Las composiciones para uso agrícola que incluyen el péptido de la presente invención pueden ser aplicadas de diversas formas sobre diversos tipos de cultivos, eligiendo en cada caso los vehículos o portadores aceptables más adecuados dependiendo de la forma de aplicación elegida.

Para que la invención aquí descrita pueda ser más completamente entendida, los siguientes métodos y ejemplos son indicados. Debe entenderse que estos métodos y ejemplos son solo para propósitos ilustrativos y no son para ser interpretados como limitantes de esta invención en cualquier manera.

MÉTODOS DE PREPARACION Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD

Método 1. Aislamiento de mitocondrias:

Ratas mach fueron decapitadas, su hígado extraído y puesto en 45 ml de una solución fría compuesta por 210 mM Manitol,

18

70 mM Sacarosa, 1 mM EGTA, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (GMSH). El hígado fue homogenizado con un homogenizador automático Dounce y un émbolo de teflón. El homogenizado se centrifugó a 600 x g por 10 min a 4°C (Centrifuga Jouan, MR1812). El sobrenadante se decantó y centrifugó a 10000 x g por 10 min a 4°C. El botón conteniendo las mitocondrias fue re-suspendido en 30 ml de una solución fría compuesta por 210 mM Manitol, 70 mM Sacarosa, 20 µM EGTA, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (MSHG) y centrifugado de nuevo a 10000 x g por 10 min a 4°C. El botón final de mitocondrias se re-suspendió en buffer MSHG a una concentración final de proteína mitocondrial de 60-80 mg/ml.

Método 2. Síntesis química de péptidos:

Los péptidos fueron sintetizados por el método de síntesis en fase sólida (Merrifield B. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis, Journal American Chemical Society. 85: 2149-2154; y Houghten R. A. 1985. General methods for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen antibody interaction at the level of individual aminoacids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 5131-5135.) bajo los métodos de buenas prácticas de manufactura (GMP). Una resina p-methyl benzidrilamínea (MBHA) (0.7 meq/g), t-boc aminoácidos (Bachem, USA) y el proceso de rompimiento bajo alto se empleó en la síntesis. (Andreu D, Merrifield RB, Steiner H, Boman HG. 1983. Solid-phase synthesis of Cecropin A and Related Peptides. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80: 6475-6479.). Una vez sintetizados, los péptidos fueron extraídos con ácido acético al 10% en agua. Los péptidos se purificaron por cromatografía de alta presión (HPLC), en una columna de

18 19

fase reversa y se analizaron mediante espectrometría de masas (Maldi-Tof). Los péptidos fueron liofilizados y mantenidos en polvo a 4°C hasta su uso. El péptido P1 es altamente soluble en soluciones acuosas.

Método 3. Ensayos de hinchamiento mitocondrial en medios isotónicos

Las mitocondrias se aislaron y prepararon como se describió arriba. Las mitocondrias fueron resuspendidas a una concentración de proteínas mitocondriales de 0.5 mg/ml en 1 ml de diferentes medios isotónicos: 125 mM NH₄NO₃, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4; 125 mM KNO₃, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4; 125 mM Tris-NO₃, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4; 125 mM NaNO₃, 5 mM HEPES-tris, pH 7.4. La adición de las mitocondrias fue inmediatamente seguida por la adición de 2.5 µM rotenona y 1 µM oligomicina (RO). Después de 1 min de incubación a temperatura ambiente, El péptido a las concentraciones indicadas en la figura 1, se adicionó a las mitocondrias. El hinchamiento mitocondrial se monitoreó espectrofotométricamente a 540 nm (Espectrofotómetro Turner, modelo SP-850, USA, modificado con un mini-agitador magnético). Las curvas fueron registradas en un registrador gráfico (Linseis modelo L250E, USA) y procesadas en programa Adobe Photoshop V5.0.

Método 4. Ensayo de actividad antimicrobiana:

Se probaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) las cuales crecieron en caldo de

17 20

cultivo Luria-Bertani a 37°C; *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) crecieron en el caldo de cultivo HBI (Difco), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus anthracis*, *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27603), *Pseudomonas aeruginosa* (Multi-Resistente), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70603). El crecimiento bacteriano, en los caldos respectivos, procedió hasta alcanzar la fase logarítmica (4 - 6 h) a un OD600 = 1.0. El caldo de cultivo se removió por centrifugación a 10000 rpm por 10 min a 4°C (Internacional Equipment Company IEC, Centra MP4R; rotor 851) y el botón, conteniendo las células bacterianas, fué lavado dos veces en un buffer compuesto por 25 mM Na₂PO₄, 25 mM NaHPO₄, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4 (PBS). Las bacterias fueron ajustadas a un OD600 = 0.2 en el mismo buffer (5000-10000 células/ml). La actividad antibacteriana in vitro del péptido se hizo como sigue: 500 µl de la suspensión bacteriana se pusieron en contacto con 7.1 µM del péptido P1 por 2 hs. a 37°C en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Después de la incubación las células se lavaron en el mismo volumen de buffer y luego platearon en cajas de Petri con agar nutritivo; después de 24 h de incubación a 37°C en las cajas de petri, las unidades formadoras de colonias se cuantificaron. El porcentaje de inhibición se obtuvo comparando el crecimiento bacteriano de las células incubadas con el péptido frente a células sin tratar.

Método 5. Actividad hemolítica del péptido P1:

La actividad hemolítica del péptido P1 se determinó en glóbulos rojos humanos heparinizados (concentración final de heparina 20.4 U/ml) tomados de un voluntario y lavados tres veces en 150 mM NaCl, 9 mM Na₂PO₄, pH 7.3, a temperatura ambiente. Los glóbulos rojos humanos fueron resuspendidos a un hematocrito de 0.5 % en las soluciones isotónicas 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Glucosa, 10 mM HEPES-tris, pH 7.4; 155 mM KCl, 5 mM Glucosa, 10 mM HEPES-tris, pH 7.4; 300 mM sacarosa, 5 mM KCl, 5 mM Glucosa, 10 mM HEPES-tris, pH 7.4 y 150 mM polietilenglicol-1500 (PEG-1500), 5 mM KCl, 5 mM Glucosa, 10 mM HEPES-tris, pH 7.4. El péptido fue solubilizado a una concentración de 2 mg/ml en 5 mM KCl, 5 mM Glucosa, 10 mM HEPES-Tris, pH 7.4 y dos concentraciones finales de 0.6 µM y 3.6 µM del péptido P1 se adicionaron a la suspensión celular (Tabla 2) por 1 h a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recobraron por centrifugación de la suspensión celular a 10000 rpm por 5 min a 4°C (Internacional Equipment Company IEC, Centra MP4R; rotor 851) y la absorbancia a 415 nm se determinó en un espectrofotómetro BIORAD. Los promedios y desviaciones estandar se calcularon y los datos se ingresaron en el programa SigmaPlot V4.0 para generar las gráficas correspondientes (Figuras 3 y 4).

Método 6. Preparación de liposomas y dicroísmo circular (CD):

Los liposomas fueron preparados como sigue: los lípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y colesterol (CH) se disolvieron en cloroformo a las proporciones molares: 1:1:1 PC:PE:CH y 1:1 PC:CH (liposomas

con proporciones correspondientes a una membrana biológica). Entonces el solvente se removió por evaporación y secó en alto vacío por 8 h. La mezcla de lípidos fue rehidratada a una concentración final de 100 mM en 25 mM Na_2PO_4 , 25 mM NaHPO_4 , 150 mM NaCl , 5 mM KCl , pH 7.4 (PBS). Los liposomas fueron homogenizados por sonicación (Sonicador Branson) por 1 h. Los liposomas y el péptido se mezclaron como sigue: 50 mM fosfolípidos (liposomas), 0.2 μM péptido en PBS, por 1 h a 5°C. Los datos fueron tomados en un espectropolarímetro (Jasco J-810).

Todos los reactivos de grado analítico fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St Louis MO. USA).

ENSAYOS BIOLOGICOS

EJEMPLO 1

Actividad Ionfórica en la mitocondria de hígado de rata

Efecto Ionofórico de P1 en la membrana interna mitocondrial de hígado de rata; P1 induce un fuerte hinchamiento de la mitocondria de hígado de rata debido a su actividad ionofórica. Esta actividad se determinó en las mitocondrias suspendidas en el medio isotónico 125 mM KNO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (Fig 1, Panel A), y 125 mM NH_4NO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 (Fig 1, Panel B) en diferentes concentraciones finales de P1 (traces a, b, and c in Fig 1, Panels A and B). La velocidad del hinchamiento mitocondrial inducido por P1 (indicado por las pendientes de las curvas) mostró ser

comparables a la observadas por valinomicina (pendiente = 1.6 con 0.18 μM de P1 y pendiente = 1.4 con 0.12 μM valinomicina, Fig 1, Panel A, curvas c y e respectivamente) en el medio 125 mM KNO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4. Un incremento significativo en el hinchamiento mitocondrial se observó cuando las mitocondrias se energizaron (pendiente = 1.6 con 0.18 μM de P1 y pendiente = 9.3 con 0.18 μM de P1 más 2.5 mM de succinato) (Fig 1, Panel A, curvas c y d, respectivamente). Igualmente, la velocidad del hinchamiento inducido por P1 fue comparable a la inducida por el desacoplador FCCP (pendiente = 2.1 con 0.36 μM de P1 y pendiente = 3.5 con 2 μM FCCP) (Fig 1, Panel B, curvas b y f, respectivamente) en el medio 125 mM NH_4NO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4. La actividad ionofórica de P1 fue también monitoreada en otros medios isotónicos: 125 mM Tris- NO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4 y 125 mM NaNO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4. La velocidad del hinchamiento mitocondrial fue diferente dependiendo del medio isotónico empleado con este orden de velocidad $\text{H}_4\text{NO}_3 > \text{KNO}_3 > \text{NaNO}_3 > \text{tris-NO}_3$ (Fig 1, Panel C, pendientes en las curvas a, b, c, y d, respectivamente). Los resultados indican que P1 induce una alta permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria para cationes, y que el efecto permeabilizante de P1 es comparable al de la valinomicina y FCCP. La figura 1, Panel D, muestra las curvas obtenidas con otros péptidos sintéticos (P9 de 14 aminoácidos, P10 de 32 aminoácidos y P11 de 29 aminoácidos). Otros péptidos probados fueron: P2 de 24 aminoácidos, P3 de 17 aminoácidos, P6 de 19 aminoácidos, P8 de 23 aminoácidos, y P12 de 18 aminoácidos

EJEMPLO 2

Efecto de las proteasas sobre la actividad ionofórica de P1 en la mitocondria; Es bien conocido que las mitocondrias tienen proteasas propias que se liberan al momento de su hinchamiento. Las mitocondrias y el péptido P1 (1.8 μ M) fueron incubados en el medio 125 mM NH_4NO_3 , 5 mM HEPES-tris, pH 7.4. Después de transcurridos 2.5, 10 y 20 minutos, nuevas mitocondrias frescas (0.5 mg/ml) se adicionaron y las pendientes resultantes se registraron a 540 nm y fueron comparadas. La figura 2, Panel A, muestra que después de 2.5 min, P1 mostró actividad ionofórica (Fig 2, Panel A, curva a), esta actividad disminuyó después de 10 min de incubación (Fig 2, Panel A, curva b) y la actividad desapareció después de 20 min (Fig 2, Panel A, curva c). Este experimento indica que la actividad ionofórica de P1 es transitoria. Una explicación es que el péptido P1 sea sensible a proteasas. Para probar esto, P1 se trato con tripsina (ver leyenda de la figura 2), y se observó que el tratamiento con tripsina del péptido P1 suprime su actividad ionofórica en la mitocondria (Fig 2, Panel B, curva +T).

EJEMPLO 3

Actividad antimicrobiana; El péptido es capaz de matar bacterias: El crecimiento de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Clostridium perfringens* (ATCC 13124)

fueron completamente inhibidas en su crecimiento en un 100 % con 7.1 μ M del P1 péptido. *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27603) y una cepa multi resistente a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron susceptibles a la misma concentración de péptido (7.1 μ M de P1) con un porcentaje de inhibición de crecimiento entre el 76 % y el 86 %. Finalmente, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70603) y el grupo de *Bacillus*, que incluye: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Bacillus anthracis*, fueron menos susceptibles a la concentración de péptido de 7.1 μ M con un porcentaje de inhibición de crecimiento entre el 30.8 % y el 40 %. La tabla 1 muestra el espectro antimicrobiano de P1.

TABLA 1

Actividad antimicrobiana del péptido P1

Bacteria	Cepa	Dosis μ M	% de inhibición de crecimiento
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	7.1	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	7.1	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	7.1	100
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247	7.1	76
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	7.1	99.6
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	7.1	30.8
<i>Bacillus anthracis</i>		7.1	40
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC25285	7.1	100
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC13124	7.1	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27603	7.1	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Multi-Resistente)		7.1	86
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC70603	7.1	39

EJEMPLO 4

Actividad hemolítica; Basado en la ausencia o presencia de actividad hemolítica, los péptidos pueden clasificarse como péptidos antibióticos o venenosos. El potencial citotóxico de P1 se determinó en globulós rojos humanos. La actividad hemolítica se observó en los medios isotónicos con sacarosa, KCl y NaCl siendo el orden de permeabilidad para sacarosa>KCl>NaCl a la concentración de péptido de 0.36 μM . Este orden de selectividad desapareció cuando la concentración de péptido subió a 3.6 μM indicando que esta c ncentración de péptido está saturada en las condiciones empleadas. Contrariamente, en el medio isotónico PEG-1500, el péptido P1 no muestra actividad hemolítica. La tabla 2 y la Figura 3 muestran la actividad hemolítica del péptido P1. De interés es que la actividad hemolítica decrece dramáticamente cuando se incrementa el hematocrito (al 10 %) indicando que el péptido se puede denominarse como un péptido antimicrobiano con muy baja o ninguna actividad citotóxica (Figura 4).

TABLA 2

Actividad hemolítica del péptido P1 en eritrocitos humanos

Medios Isotónicos	Porcentaje de hemólisis	
	0.36 μM de P1	3.6 μM de P1
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
PEG-1500 150 mM	0,25 $\pm$ 0,07	2,75 $\pm$ 0,3
Sacarosa 150 mM	57,5 $\pm$ 0,73	75,5 $\pm$ 10,38
KCl 150 mM	17,25 $\pm$ 1,05	64,25 $\pm$ 1,23
NaCl 150 mM	3,75 $\pm$ 0,05	59,25 $\pm$ 1,15

EJEMPLO 5

Estructura del péptido P1; La estructura en solución del péptido P1 fue estudiada mediante el método espectroscópico denominado dicroísmo circular (CD), este es un tipo de espectroscopía de absorción que puede dar información acerca de la estructura de muchos tipos de macromoléculas biológicas. El fenómeno de dicroísmo circular es muy sensible a la estructura secundaria de los polipéptidos. En un ambiente acuoso, el péptido P1 tiene predominantemente una conformación al azar (Tabla 3). El contenido (expresado en porcentaje) de estructura organizada del péptido P1 se incrementa con el incremento en la concentración de trifluoroetanol (TFE); estos datos indican que en un medio de mayor hidrofobicidad, el péptido P1 preferencialmente adopta una conformación helicoidal (Figura 3). El efecto estabilizador del TFE se sugiere por la preferencia de las moléculas de TFE a agregarse en los alrededores del péptido. Como consecuencia de este efecto, el agua alrededor del péptido es desplazada, removiendo los puentes de hidrógeno que proveen un ambiente dieléctrico bajo, esto a su vez, favorece la formación de puentes de hidrógeno en el interior del péptido y por lo tanto la estructura de alfa hélice (Roccatano D., Colombo G., Fioroni M., and. Mark A.E. 2002. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 12179-12184.). De todas maneras, la estructura del péptido en TFE puede ser diferente de la que se pueda formar en el ambiente hidrofóbico de una membrana biológica, donde el

péptido interactúa con lípidos. Esta es la razón por la cual los experimentos con liposomas fueron realizados. La figura 4 muestra el espectro de CD del péptido P1 en el ambiente hidrofóbico de dos tipos de membranas liposomales: Los liposomas preparados en las proporciones molares 1:1:1 en PC, PE y CH o 1:1 en PC:CH pueden asemejar la composición lipídica de una membrana biológica. El espectro CD revela que el péptido P1 puede adoptar una conformación alfa-helicoidal cuando este interactúa con los lípidos de los liposomas (Figura 4). En estos experimentos, el péptido unido a los liposomas con una proporción en colesterol mayor (1:1 PC:CH).

TABLA 3

Espectro de dicroísmo circular del péptido P1 en un medio de Hidrofobicidad creciente (% de TFE).

%TFE	% estructura secundaria (fracción)				% Total (fracción)
	Hélice	Beta	Vuelta	Desordena da	
0	0.0	27.3	11.4	61.3	100.0
	(474.6)	(474.6)	(198.2)	(1066.1)	(1738.9)
10	19.4	33.1		47.5	100.0
	(407.5)	(697.3)	0.0 (0)	(999.3)	(2104.1)
20	40.5	17.6		42.0	100.0
	(829.9)	(360.2)	0.0 (0)	(861.4)	(2051.4)
30	54.6			35.7	100.0
	(1456.1)	9.6 (256.9)	0.0 (0)	(951.9)	(2664.9)
40	68.2			31.8	100.0
	(1479.4)	0.0 (0)	0.0 (0)	(688.2)	(2167.6)
50	65.2			34.8	100.0
	(1455.7)	0.0 (0)	0.0 (0)	(777.9)	(2233.5)

*TFE Trifluoroetanol diluido en agua pura (H₂O) a las concentraciones indicadas, la concentración final del péptido fue 0.18 µM.

SECUENCIA DEL PEPTIDO DE LA PRESENTE INVENCION

INFORMACIÓN GENERAL:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA

IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA: P1

LONGITUD: 26

TIPO: aminoácido

ENCADENAMIENTO: una sola cadena

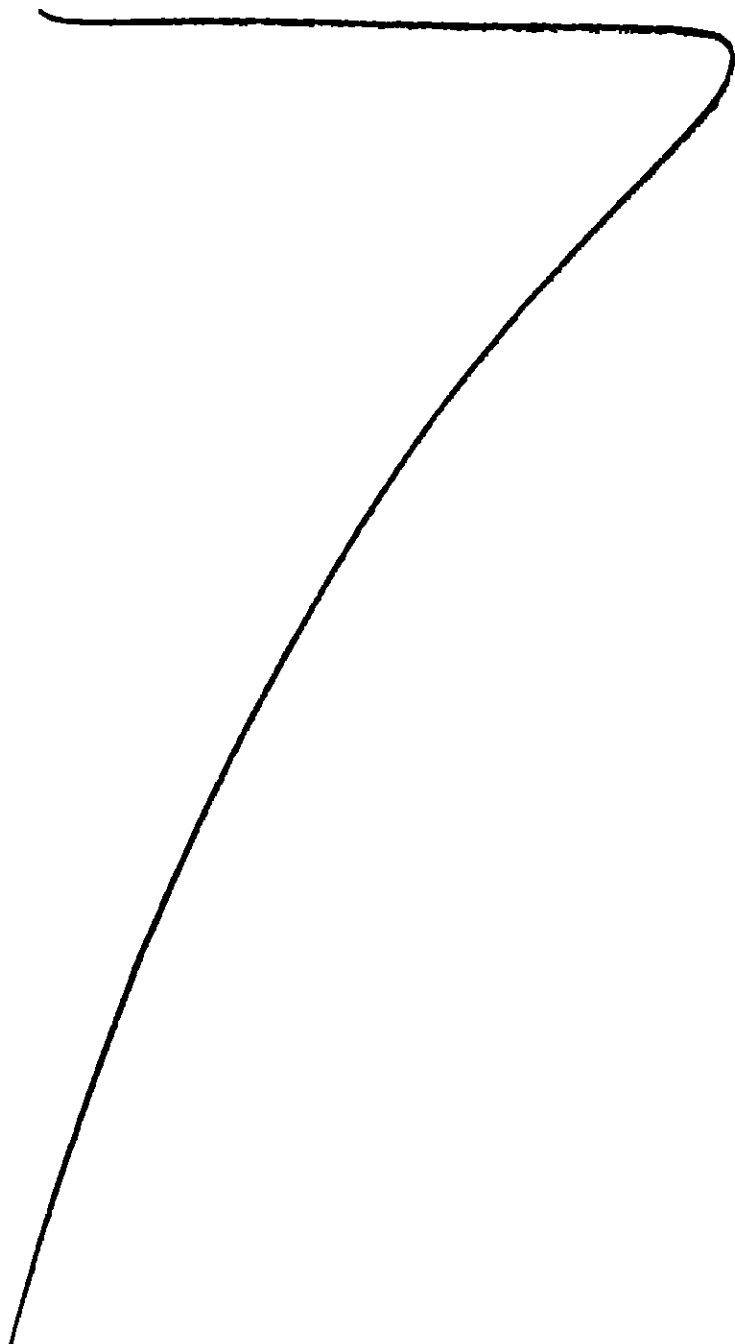
TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: péptido

SECUENCIA:

***La secuencia de aminoácidos del peptido P1 esta en la siguiente secuencia:**

VAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS



REIVINDICACIONES

1. Un péptido, caracterizado por poseer la siguiente secuencia de aminoácidos: VAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS y sales derivados farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. El péptido acorde con la reivindicación 1, caracterizado porque muestra actividad antimicrobiana y ionofórica.

3. El péptido acorde con la reivindicación 2, en donde la actividad antimicrobiana es contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

4. El péptido acorde con la reivindicación 1, en donde la actividad ionofórica es en la membrana interna de la mitocondria del hígado de rata.

5. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo el peptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo el peptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento microbiano de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, junto con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo el peptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en una cantidad efectiva para exhibir actividad ionóforica, junto con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una composición farmacéutica acorde con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizada porque se presenta en una forma adecuada para administración, oral, rectal, o parenteral.

9. Una composición para uso agrícola que comprende como ingrediente activo el peptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con un portador o vehícul aceptable.

10. Una composición para uso agrícola que comprende como ingrediente activo el peptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento microbiano de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, junto con un portador o vehículo aceptable.

11. Una composición farmacéutica acorde con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, caracterizada porque se presenta en una forma adecuada para su aplicación en la agricultura.

FIGURA 1

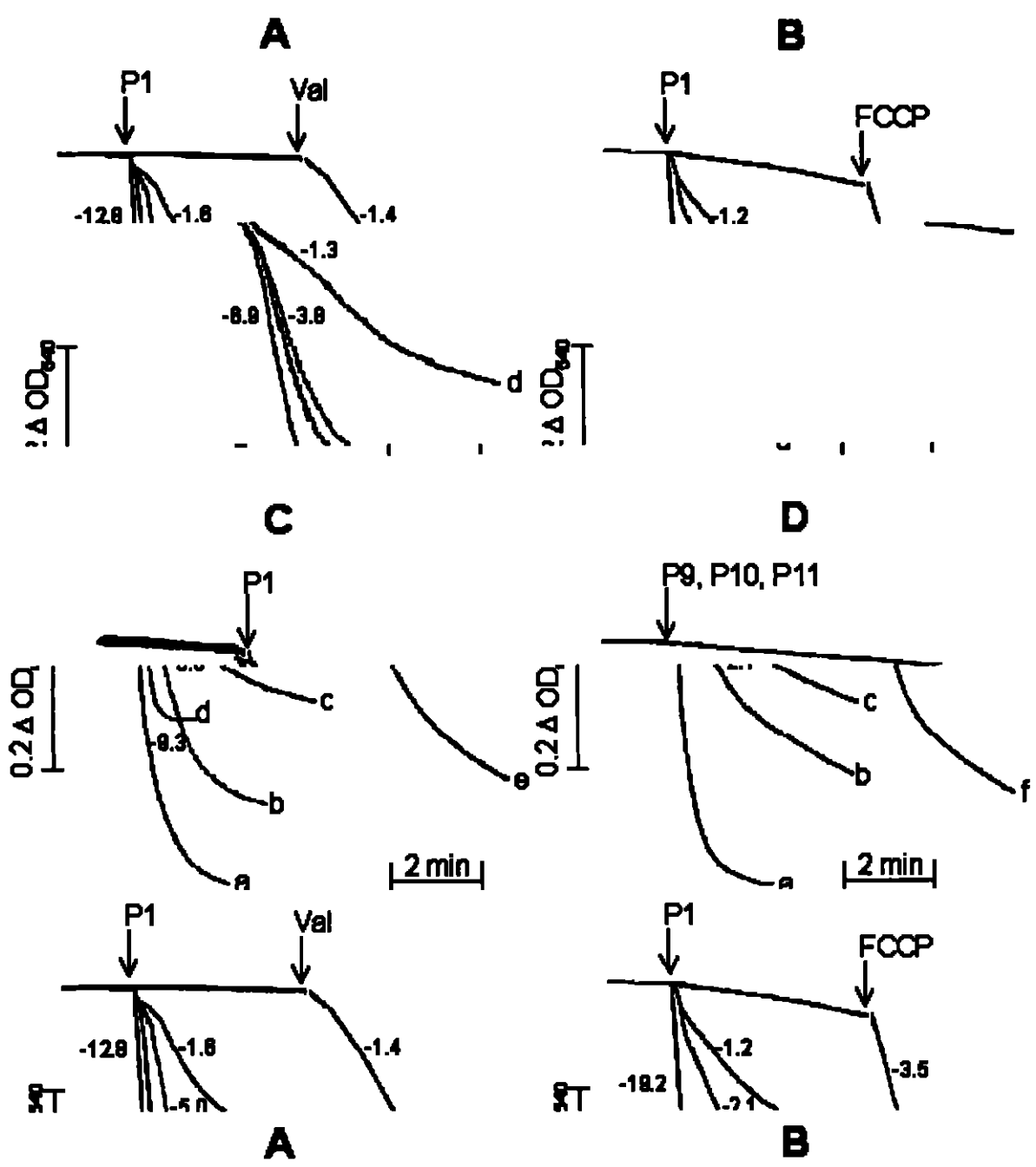


FIGURA 2

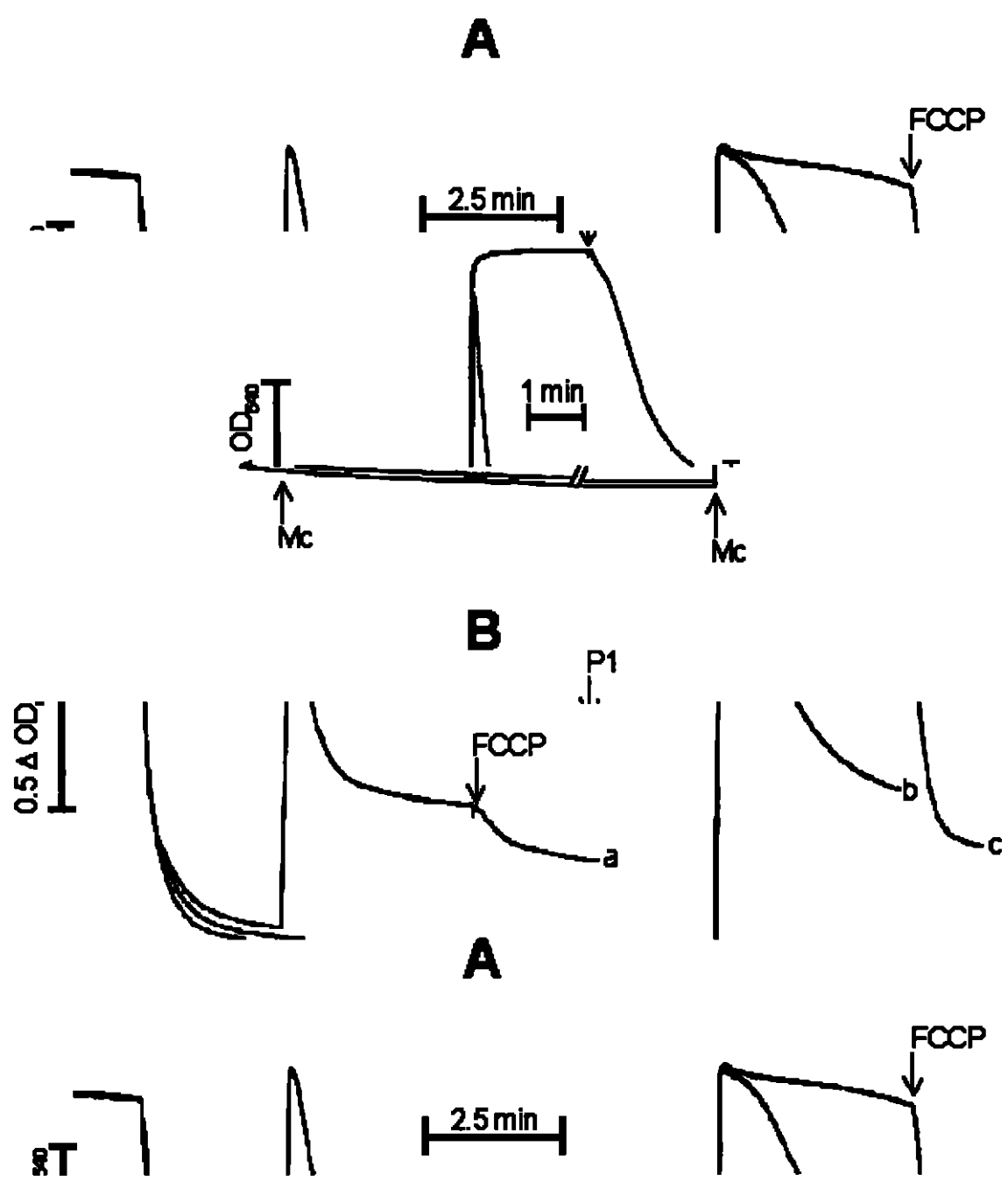


FIGURA 3

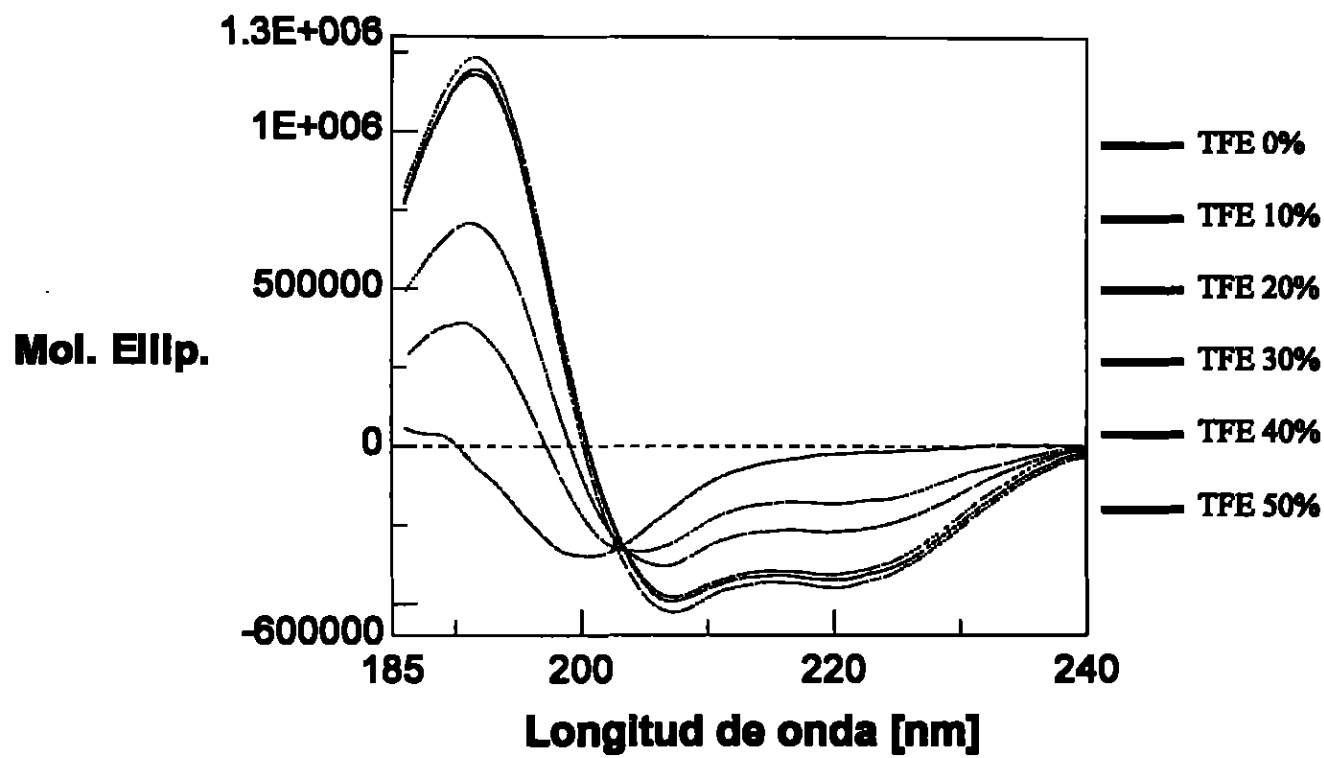


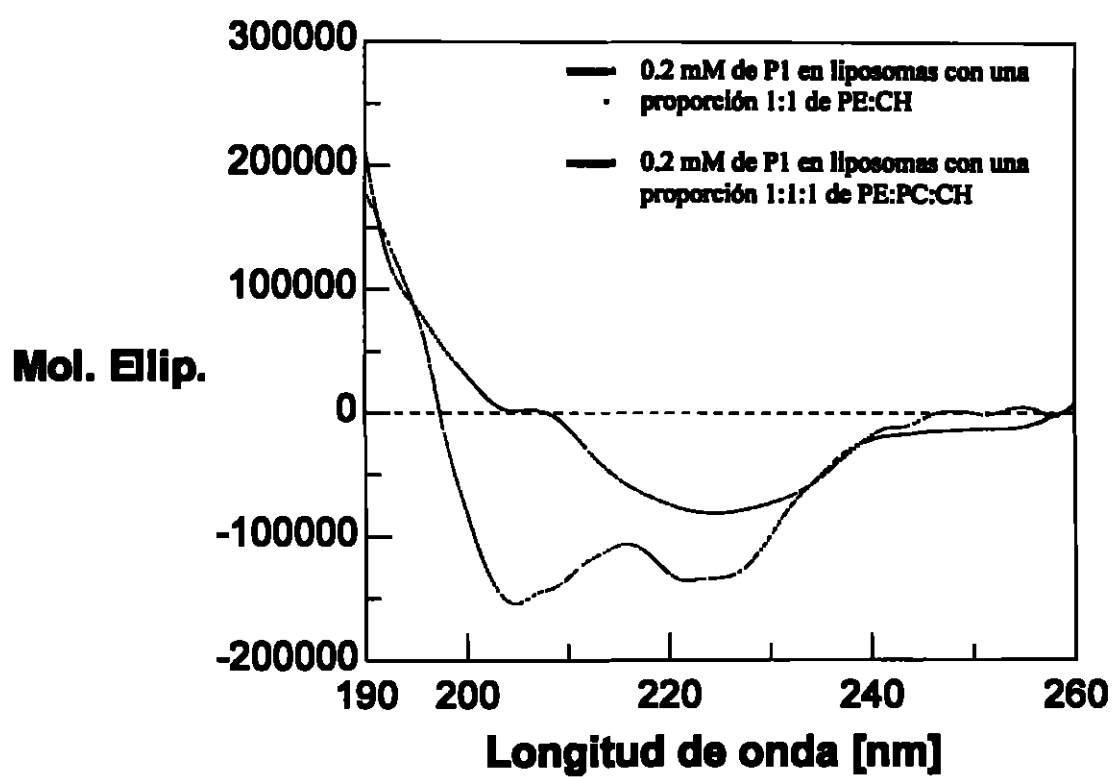
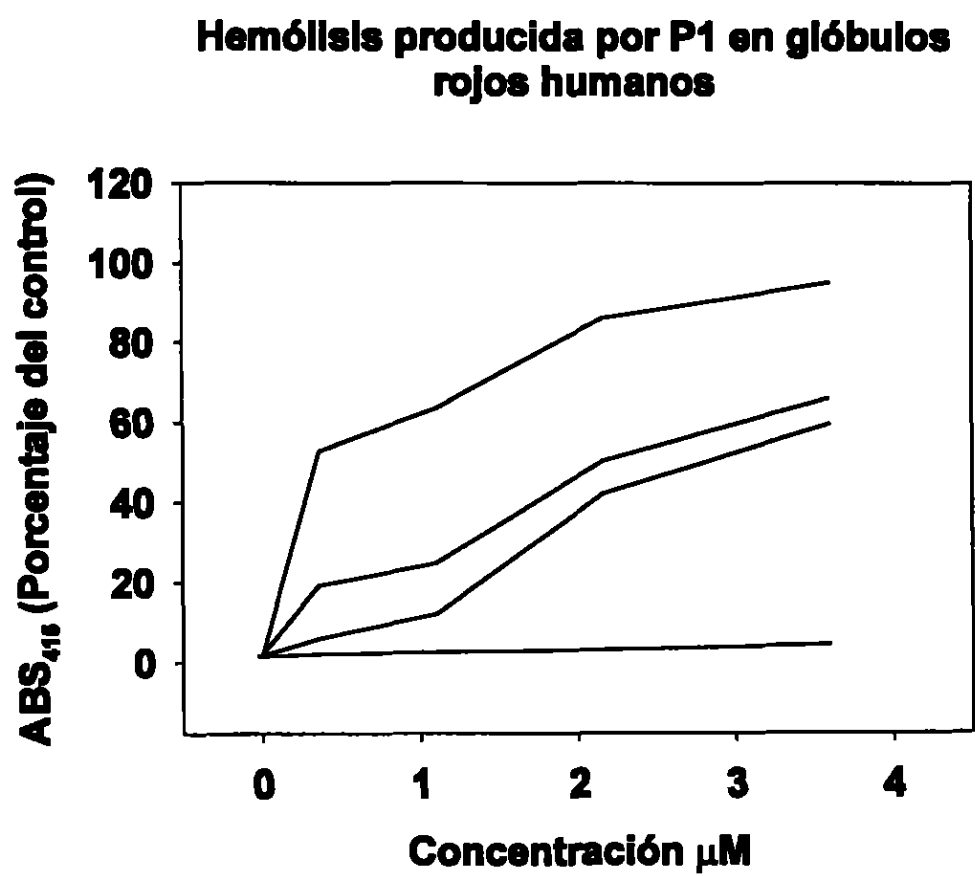
FIGURA 4

FIGURA 5



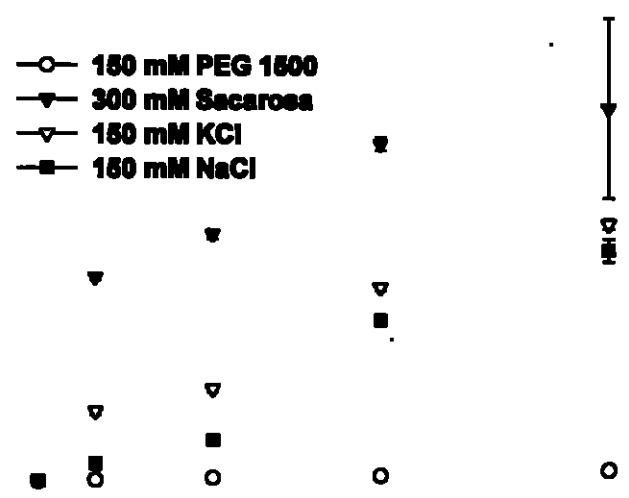
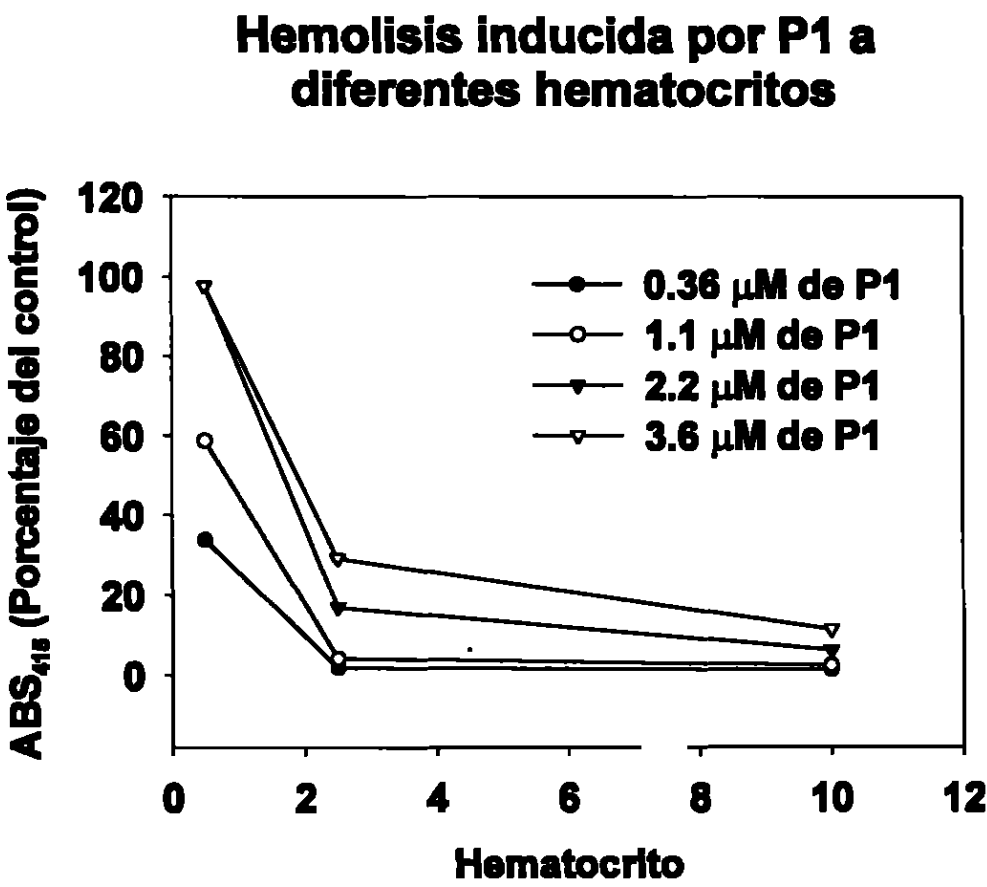


FIGURA 6





Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 03027139 00000000 Folios: 41
Fecha: 2003-04-01 16:29:09
Tramite: 000 PATENTES 3 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 10,871
FECHA : MARZO 13 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MARRA RODRIGUEZ & CAVE	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-0010-6	0702908	13/03/2003	2,150,000.00

***** C E P T O *****

CANT. CONTISTICE	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

VAPIAKYLATALAKWALKQGFALKS

VAPIAKYLATALAKWALKQGEAKLKS

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	(x)
MODELO DE UTILIDAD	()	(x)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(x)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	(x)
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	(x)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	(x)
COMPLETA (x)	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 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 de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Eduar Navarro
01-04-2003

Fecha:

2020
Bogotá, D. C.

Doctor(a)
ERNESTO CAVELIER FRANCO

Oficio No. 08992

REFERENCIA:	Radicación	03-27159
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Folios	001

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:

- Allegar copia del documento en que conste la cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores al solicitante o a su causante. (art. 26-k, Dec 486/2000).
- 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. Cuando se requiera debe allegarse la sustitución del poder, otorgada por quien aparece como apoderado principal. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

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

23 OCT. 2003

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

2009
11/10/09
B. J. J.
23/03

