



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-016116-00000-0000

Fecha: 2013-01-29 13:51:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 37

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO PEPTIDO SINTETICO POLICATIONICO
CON PROPIEDADES IONOFORICAS, ANTIMICROBI
ANAS ANTITUMORALES E INSECTICIDAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE UNIVERSIDAD NACIONAL

DOMICILIO CR 45 - No 26 - 85

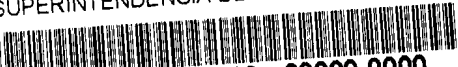
74. APODERADO Julio Cesar Padilla

22. BOGOTÁ, D.C., 29 Enero 2013



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-016116-00000-0000

Fecha: 2013-01-29 13:51:17
Tra 2 PATENTES
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 1 REGDEPOSITO
Folios: 27 38

ión

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD DE PATENTE - NACIONAL

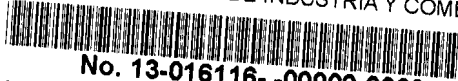
1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad	
2	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)	3	CIP Clasificación Internacional de Patentes
PEPTIDO SINTETICO POLICACIONICO CON PROPIEDADES IONFORICAS, ANTIMICROBIANAS ANTITUMORALES E INSECTICIDAS			
4	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
1 APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
UNIVERSIDAD NACIONAL			879999063-3 NIT
5	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: CRA 45 No 26 -85 CIUDAD: BOGOTÁ D.C. DEPARTAMENTO/ESTADO: BOGOTÁ D.C. PAÍS DE RESIDENCIA: COLOMBIA		No. TELÉFONO: 316 5000 CORREO ELECTRÓNICO: jpadilla@unal.edu.co NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN: COLOMBIA	
6	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. ORDOZ PERALTA	SERGIO		COLOMBIANO
2. LEMESHEO	VIKTOR		COLOMBIANO
3.			
4.			
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
7	DATOS INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1. COLOMBIA	BOGOTÁ D.C.	BOGOTÁ D.C.	CRA 45 No 26-85
2. COLOMBIA	BOGOTÁ D.C.	BOGOTÁ D.C.	CRA 45 No 26-85
3.			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
8	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
PADILLA HERRERA		JULIO CESAR	C.C. 1052429151 T.P. 200453
DIRECCIÓN: CRA 45 No 26-85 CIUDAD: BOGOTÁ D.C. PAÍS: COLOMBIA		No. TELÉFONO: 310 2001043 CORREO ELECTRÓNICO: jpadilla@unal.edu.co No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL:	
9	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☒ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1.			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
2.			
3.			

10	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
12	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☒ SI ☐ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☒ Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
13	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
14	PARA PUBLICAR A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN O DE LA PRIORIDAD INVOCADA:		15
<i>Si es Patente de Invención</i> ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro Cual:		<i>Si es Patente de Modelo de Utilidad</i> ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ Otro Cual:	N° Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i> APODERADO			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica 1. ☐ Descripción N° de folios: 2. ☐ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios: 4. ☐ Resumen. 5. ☐ Documento de Prioridad. 6. ☐ Traducción del documento de prioridad. 7. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 8. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 9. ☐ Arte final 12 x 12. 10. ☐ Anexo formato digital.		Documentación Jurídica 11. ☐ Poderes, si fuera el caso. 12. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 13. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, si fuera el caso. 14. ☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos tradicionales, o certificado o número de registro, si fuera el caso. 15. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 18. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 19. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 008677	
				Bogotá D.C., Enero 29 de 2013 - 13:10:07	
RECIBIDO DE : UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA				NI 899.999.063	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	8503	28/01/2013		387.500.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	498343370	29/01/2013	102.500.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2247 DTO 50% TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN			250.000.00	250.000.00
					\$250.000.00
=====					
SON: **DOSCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-016116- -00000-0000 Fecha: 2013-01-29 13:51:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO Act. 411 PRESENTACION Folios: 37					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Enero 29 de 2013 - 13:10:08					

VX

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 -/-					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 008678	
				Bogotá D.C., Enero 29 de 2013 - 13:10:07	
RECIBIDO DE : UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA				NI 899.999.063	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	8503	28/01/2013		387.500.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	498343370	29/01/2013	102.500.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
8 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC			30.000.00	240.000.00
					\$240.000.00
=====					
SON: **DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-016116- -00000-0000 Fecha: 2013-01-29 13:51:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO Act. 411 PRESENTACION Folios: 37					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Enero 29 de 2013 - 13:10:08					



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

RECTORÍA

0091

Bogotá, D. C. 23 FNE 2012

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Carrera 13 27-00

Bogotá, D.C.

REFERENCIA: Poder

IGNACIO MANTILLA PRADA identificado con cédula de ciudadanía 19.328.350 de Bogotá, actuando en nombre y representación de la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**, ente universitario autónomo del orden nacional, en mi calidad de Rector, nombrado por Resolución 032 del 29 de Marzo de 2012 y posesionado según consta en el Acta No. 001 del 02 de Mayo del mismo año y por tanto Representante legal de ella, conforme a lo dispuesto en el artículo 13 del decreto 1210 de 1993, a usted me permito manifestar que otorgo poder especial, amplio y suficiente a **JULIO CESAR PADILLA HERRERA**, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, con cédula de ciudadanía 1.032.429.151 de Bogotá, Abogado en ejercicio portador de la Tarjeta Profesional No. 200453 del Consejo Superior de la Judicatura, para que adelante el trámite legal de registro de patente "PEPTIDO SINTETICO POLICATIONICO CON PROPIEDADES IONOFORICAS ANTIMICRONIANAS, ANTITUMORALES E INSECTICIDAS" cuyos inventores son Sergio Orduz Peralta y Viktor Lemeshko.

El Abogado Julio Padilla, queda ampliamente facultado para recurrir, pedir pruebas, tramitar incidentes y demás facultades previstas en la ley para este tipo de mandatos.

Atentamente,


IGNACIO MANTILLA PRADA
C. C. 19.328.350 de Bogotá



Acepta

JULIO CESAR PADILLA HERRERA
C. C. 1.032.429.151 de Bogotá
T. P. 200453 del C. S. de la J.

Reparto 377 - 2012. Julio Padilla

145 años

Innovando

Carrera 45 No. 26-85, EDIFICIO URIEL GUTIÉRREZ, piso 5º Oficina 571
Teléfono: (57-1) 316 5469 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 18022 - 18025 -18010 -18015 Fax: Ext. 18015
Correo electrónico: rectoriaun@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Mantel





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SECRETARÍA GENERAL

**LA SECRETARIA GENERAL DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

HACE CONSTAR:

Que por Ley 66 de 1867 se creó la Universidad Nacional de Colombia.

Que la Ley 30 de 1992, otorgó facultades extraordinarias al Presidente de la República para reestructurar la Universidad Nacional de Colombia.

Que en virtud de esas facultades, se expidió el Decreto Número 1210 de 1993, "Por la cual se reestructura el régimen orgánico de la Universidad Nacional de Colombia".

Que según el Artículo 1º del Decreto 1210 de 1993, la Universidad Nacional de Colombia es un ente universitario autónomo del orden nacional vinculado al Ministerio de Educación Nacional, con régimen especial, de carácter docente e investigativo.

Que según el Artículo 3º del mismo Decreto la Universidad Nacional de Colombia es una persona jurídica autónoma, con gobierno, patrimonio y rentas propias.

Que de conformidad con el Artículo 13 del mismo Decreto el Rector es el representante legal de la Universidad y el responsable de su dirección académica y administrativa.

Que la Universidad Nacional de Colombia tiene su domicilio en la ciudad de Bogotá, Distrito Capital.

Que según resolución No.032 del 29 de marzo de 2012 y Acta de Posesión Número 001 del 02 de mayo de 2012 del Consejo Superior Universitario, el doctor **IGNACIO MANTILLA PRADA**, identificado con la Cédula de Ciudadanía número 19.328.350 de Bogotá, ejerce las funciones de Rector de la Universidad Nacional de Colombia para el periodo 2012-2015.

Esta constancia se expide en Bogotá, a los


CATALINA RAMÍREZ GÓMEZ
Secretaria General

Mireya N.

145 años
Innovando

Carrera 45 No. 26-85, EDIFICIO URIEL GUTIÉRREZ, piso 5º. Oficina 557
Teléfonos: 3165280 Conmutador: 3165000 ext 18050 - 18054 - 18351
Telefax: 3165107 ext 18052
Correo electrónico: secgener@unal.edu.co
Bogotá Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
CONSEJO SUPERIOR UNIVERSITARIO

RESOLUCIÓN 032 DE 2012
(Acta 03 del 29 de marzo)

"Por la cual se designa al profesor **IGNACIO MANTILLA PRADA** como Rector de la Universidad Nacional de Colombia para el periodo institucional 2012 – 2015"

EL CONSEJO SUPERIOR UNIVERSITARIO,
en uso de sus atribuciones legales y estatutarias, específicamente de lo establecido en el artículo 14, numeral 3 del Acuerdo 011 de 2005 del Consejo Superior Universitario – Estatuto General y en el artículo 12, literal c, del Decreto Extraordinario Decreto 1210 de 1993

RESUELVE:

ARTÍCULO 1. Designar al profesor **IGNACIO MANTILLA PRADA**, identificado con la Cédula de Ciudadanía 19.328.350 de Bogotá, como Rector de la Universidad Nacional de Colombia para el periodo institucional comprendido entre el 2 de mayo de 2012 y el 1 de mayo de 2015.

ARTÍCULO 2. La presente resolución rige a partir de la fecha de su expedición.

COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE.-

Dada en Bogotá, D.C., a veintinueve (29) de marzo de dos mil doce (2012)


MARÍA FERNANDA CAMPO SAAVEDRA
Presidenta


JORGE ERNESTO DURÁN PINZÓN
Secretario



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
CONSEJO SUPERIOR UNIVERSITARIO

ACTA DE POSESIÓN No. 001

En Bogotá, D.C., hoy dos (02) de mayo del año dos mil doce (2012), en presencia de la Señora Ministra de Educación Nacional, en su calidad de Presidenta del Consejo Superior Universitario, tomó posesión del cargo de Rector de la Universidad Nacional de Colombia el Doctor **IGNACIO MANTILLA PRADA**, quien fue designado mediante Resolución No. 032 de fecha 29 de marzo de 2012, expedida por el Consejo Superior Universitario.

El posesionado se comprometió ante el Consejo Superior Universitario a cumplir la Constitución de la República, las leyes y los reglamentos de la Universidad Nacional de Colombia, sirviendo con lealtad a la Nación y a la Universidad en el desempeño de la misión que se le encomienda.

Adjunta los siguientes documentos:

- Cédula de Ciudadanía No. 19.328.350 de Bogotá
- Libreta Militar No. 19.328.350 – D.M. No. 1

Para que conste, se refrenda la presente Acta con las firmas de la Presidenta del Consejo Superior Universitario y del posesionado.

MARÍA FERNANDA CAMPO SAAVEDRA
La Presidenta

IGNACIO MANTILLA PRADA
El Posesionado

REPUBLICA DE COLOMBIA
IDENTIFICACION PERSONAL
CEDULA DE CIUDADANIA

NUMERO 19.328.350

MANTILLA PRADA

APELLIDOS

IGNACIO

NOMBRES

FIRMA



INDICE DE FIEBRE

FECHA DE NACIMIENTO 12-ABR-1957

LOS SANTOS
(SANTANDER)

LUGAR DE NACIMIENTO

1.73

ESTATURA

O+

G.S RH

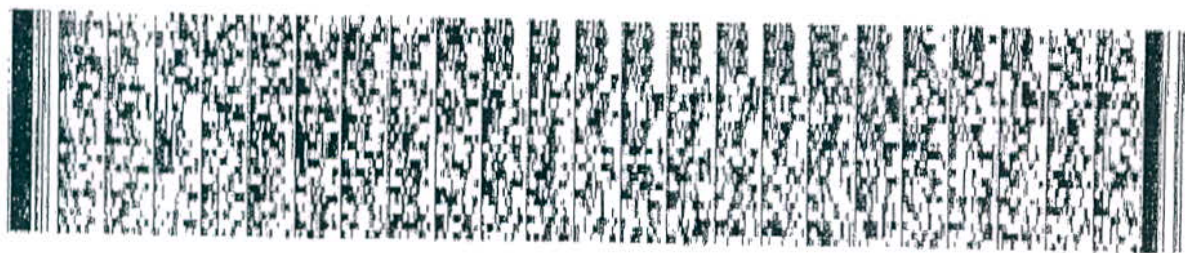
M

SEXO

25-FEB-1977 BOGOTA D.C.

FECHA Y LUGAR DE EXPEDICION

Carlos Ariel Sanchez Torres
REGISTRADOR NACIONAL
CARLOS ARIEL SANCHEZ TORRES



A-1500100-00027724-M-0019328350 20080721

0001318332A 1

6180001914



Formulario del Registro Único Tributario
Hoja Principal



2. Concepto 02 Actualización

4. Número de formulario

14171671491



(415)7707212489984(8020)0000014171671491

5. Número de identificación Tributaria (NIT):

8 9 9 9 9 9 0 6 3

6. DV

12. Dirección nacional

Institutos de Grandes Contribuyentes

14. Emisión electrónica

3 1

IDENTIFICACION

Tipo de contribuyente:

Persona jurídica

25. Tipo de documento:

1

26. Número de identificación:

Lugar de expedición

28. País:

29. Departamento:

30. Ciudad/Municipio:

31. Primer apellido

32. Segundo apellido

33. Primer nombre

34. Otros nombres

Razón social:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

36. Nombre comercial:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

37. Sigla:

U.N.

UBICACION

38. País:

COLOMBIA

39. Departamento:

Bogotá D.C.

40. Ciudad/Municipio:

Bogotá, D.C.

0 0 1

41. Dirección

CR 45 26 85

42. Correo electrónico:

rectoriaun@unal.edu.co

43. Apellido aéreo

1 4 4 9 0

44. Teléfono 1:

3 1 6 5 4 6 9

45. Teléfono 2:

3 1 6 5 0 0 0

CLASIFICACION

Actividad económica

Ocupación

Actividad principal

Código:

8 0 3 0

47. Fecha inicio actividad:

1 9 6 8 0 1 0 2

Actividad secundaria

Código:

48. Fecha inicio actividad:

49. Código:

50. Código:

1 2

51. Código:

52. Número establecimientos

1 3

Responsabilidades

53. Código:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	3	6	7	8	9	1	4	1	0								

13- Gran contribuyente

14- Informante de exogene

06- Ingresos y patrimonio.

10- Usuario aduanero

07- Retención en la fuente a título de renta

08- Retención timbre nacional

09- Retención en la fuente en el impuesto sobre las v

Usuarios aduaneros

Exportadores

54. Código:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	2	2	3						

55. Forma	56. Tipo
3	3

Servicio	1	2	3
57. Modo	2	4	
58. CPC	8 1	8 1	

Para uso exclusivo de la DIAN

59. Anexos:

SI

NO

X

60. No. de Folios:

0

61. Fecha:

2 0 1 2 0 5 2 2

La información contenida en el formulario, será responsabilidad de quien lo suscribe y en consecuencia corresponden exactamente a la realidad; por lo anterior, cualquier falsedad en que incurra podrá ser sancionada.

Artículo 15 Decreto 2786 del 31 de Agosto de 2004.

Firma del solicitante:

Sin perjuicio de las verificaciones que la DIAN realice.

Firma autorizada:

984. Nombre MANTILLA PRADA IGNACIO

985. Cargo Representante legal Certificado

Declaración de Cesión de Derechos de Inventor

Sergio Orduz Peralta, identificado con cédula de ciudadanía 5.645.041 ciudadano colombiano, domiciliado en la ciudad de Medellín, por el presente documento declaro ser el inventor de la invención titulada "PÉPTIDO SINTÉTICO POLICATIÓNICO CON PROPIEDADES IONOFÓRICAS, ANTIMICROBIANAS, ANTITUMORALES E INSECTICIDAS", y cedo en plena propiedad y sin reserva ni limitación alguna, todos mis derechos sobre la misma a favor de la Universidad Nacional de Colombia, con domicilio en la Carrera 30 No 45-03, Bogotá D.C y quien podrá solicitar y obtener a su nombre, la respectiva patente de invención en la República de Colombia.

Para constancia firmó hoy



Sergio Orduz Peralta

C.C. 5.645.041

RECONOCIMIENTO DE CONTENIDO Y DE FIRMA

Al despacho de la Notaría CATORCE del Circuito de Medellín,
compareció (eron) Sergio Orduz Peralta

Identificado (s) con C.C. N° (s) 5.645.041
Y manifestó (aron): Que reconoce (n) como cierto el contenido del presente documento, y que es (son) suya (s) la (s) firma (s) que en el mismo aparece (n). En constancia, firma (n). *

Autorizo el anterior reconocimiento.

Medellín, 24 AGO 2012



DECLARACION DE CESION DE DERECHOS DE INVENTOR.

VIKTOR LEMESHKO, identificado con cédula de ciudadanía 1.017.183.645. ciudadano colombiano, domiciliado en la ciudad de Medellín, por el presente documento declaro ser el inventor de la invención titulada "PEPTIDO SINTETICO POLICATIONICO CON PROPIEDADES INOFORICAS, ANTIMICROBIANAS, ANTITUMORALES E INSECTICIDAS", y cedo en plena propiedad y sin reserva ni limitación alguna, todos mis derechos sobre la misma a favor de la Universidad Nacional de Colombia, con domicilio en la Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, D.C. y quien podrá solicitar y obtener a su nombre, la respectiva patente de invención en la República de Colombia.

Para constancia , firmo hoy, 24 de agosto de 2012.



VIKTOR LEMESHKO
C.C. 1.017.183.645.

RECONOCIMIENTO DE CONTENIDO Y DE FIRMA

Al despacho de la Notaría CATORCE del Circuito de Medellín,
compareció (eron): Viktor Lemeshko

Identificado (s) con C.C. N° (s) 1.017.183.645
Y manifestó (aron): Que reconoce (n) como cierto el contenido del presente documento, y que es (son) suya (s) la (s) firma (s) que en el mismo aparece (n). En constancia, firma (n). *

Autorizo el anterior reconocimiento

Medellín, 24 AGO 2012



13

PÉPTIDO SINTÉTICO POLICATIÓNICO CON PROPIEDADES IONOFÓRICAS, ANTIMICROBIANAS, ANTITUMORALES E INSECTICIDAS

Viktor V. Lemesenko, Medellín (CO)

5 Sergio Orduz, Medellín (CO)

1. Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de los péptidos bioactivos. Más
10 específicamente un péptido sintético que inhibe el crecimiento microbiano, incluyendo
bacterias gram positivas y gram negativas, hongos filamentosos y levaduras, al igual
que inhiben el crecimiento de las células tumorales y matan larvas de insectos. Este
péptido también muestra actividad ionofórica en mitocondrias de hígado de rata.
Además, se proporcionan composiciones antisépticas, farmacéuticas y de uso agrícola
15 que contiene dicho péptido, así como sus genes artificiales para ser utilizados en el
desarrollo de organismos transgénicos.

2. Descripción del estado del arte

20 Son bien conocidos los problemas que la humanidad enfrenta en el campo de la lucha
contra las enfermedades infecciosas, el cáncer y el control de insectos vectores de
enfermedades, siendo el principal problema, la búsqueda de nuevas moléculas que
controlen la resistencia a los ingredientes activos, que sean específicos y que a la vez
tengan las características de un buen medicamento o compuesto insecticida.

25 En el campo de los antimicrobianos se han descrito gran cantidad de péptidos derivados
de la mayoría de grupos de organismos. Se han construido bases de datos especializadas
en las que se encuentran reportados péptidos antimicrobianos a partir del año 2002.
Principalmente, bases de datos de péptidos antimicrobianos, en general: Wang G. et al.
30 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide
design. Nucleic Acids Res. 37 (Database issue), D933-D937; Thomas S. et al. (2010).
CAMP: a useful resources for research on antimicrobial peptides. Nucleic Acids Res. 38
(Database issue), D774-D780; Fjell C.D. et al. 2007. AMPer: a database and an
automated discovery tool for antimicrobial peptides. Bioinformatics 23: 1148-1155;

- 35 Seebah S. et al. 2007. Defensins knowledge base: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue), D265-D268; Hammami R. et al. 2010. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocine characterization. *BMC Microbiol.* 10, 22). Así mismo, hay bases de datos para peptaiboles (Whitmore L. and
- 40 Wallace B.A. 2004. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Res.* 32 (Database issue), D593-D594.), secuencias de proteínas cíclicas (Wang C.K. et al. 2008. CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Res.* 36 (Database issue), D206-D210), de péptidos
- 45 antimicrobianos de camarones (Gueguen Y. et al. 2006. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 283-288) y de péptidos antimicrobianos derivados de plantas (Hammami R. et al. 2009. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue),
- 50 D963-D968). Igualmente se encuentran bases de datos sobre péptidos antimicrobianos recombinantes (Li Y. and Chen Z. 2008. RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 289: 126-129) y finalmente, de péptidos antimicrobianos sintéticos (Wade D. and Englund J. 2002. Synthetic antibiotic peptides database. *Protein Pept. Lett.* 9: 53-57).

55

Dentro del grupo de péptidos antimicrobianos existe un conjunto que se caracteriza por ser policatiónicos y anfipáticos, con tendencia a formar hélices alfa en medios hidrofóbicos, todos ellos derivados del sistema inmune de diversos organismos. Dentro de la categoría de péptidos policatiónicos y anfipáticos también se encuentra el péptido

60 BTM-P1, de 26 aminoácidos, con propiedades antimicrobianas (Lemeshko V.V. et al. 2006. Synthetic peptide having anionophoric and antimicrobial activity. U.S. Patent No. 7,041,647), derivado de la toxina Cry11Bb (Orduz S. et al. 1998. Sequence of the Cry11Bb gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. *Biochem. Biophys. Acta.* 1388: 267-272) de la bacteria *Bacillus*

65 *thuringiensis* serovar. *medellin* (Orduz S. et al. 1992. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* from Colombia, toxic to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 99-103).

De otra parte, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Blanco E. et al. 2011. Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects. Cancer Sci. 102: 1247-1252.). En el 2008 se reportaron alrededor de 7 millones de muertes a causa de cáncer (cerca del 13% de todas las muertes) y se espera un incremento en el número de nuevos casos de cáncer (Jemal A. et al. 2011. Global cancer statistics. CA: A Cancer J. Clin. 61: 69-90). Aunque la incidencia de esta enfermedad es variable en diferentes regiones del mundo, toda la población humana está en riesgo. Los fármacos actuales contra el cáncer no son selectivos y matan tanto a células tumorales como las células normales. A pesar de un enorme progreso en la campo de la investigación del cáncer, todavía hacen falta esfuerzos para diseñar nuevas moléculas, más eficaces, incluyendo los péptidos (Tang Y. et al. 2010. Simultaneous delivery of chemotherapeutic and thermal-optical agents to cancer cells by a polymeric (PLGA) nano carrier: an in vitro study. Pharm. Res. 27: 2242-2253).

Por lo tanto, el diseño de fármacos que se dirigen específicamente a las células tumorales sin afectar las células normales es todavía un reto y una de las tareas más difíciles para los investigadores. Para superar esta limitación se han desarrollado diversos enfoques, estrategias y sistemas de suministro. Dichos enfoques incluyen el uso de péptidos que penetran las células y péptidos que tienen como blanco células tumorales, entre otras moléculas (Khandare J.J. and Minko T. 2006. Antibodies and peptides in cancer therapy. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 23: 401-435). Aunque los péptidos representan sólo una parte de los agentes terapéuticos actuales, su potencial está siendo mejorado por las nuevas tecnologías, que permiten hacerles modificaciones, mejorar su disponibilidad, estabilidad y su aplicación en entornos preclínicos (Li Z.J. and Cho C.H. 2010. Development of peptides as potential drugs for cancer therapy. Curr. Pharm. Des. 16(10): 1180-1189; Schweizer F. 2009. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. Eur. J. Pharmacol. 625(1-3): 190-194).

Existe además una base de datos curada manualmente que contiene alrededor de 740 péptidos derivados de publicaciones o patentes, con información relevante respecto a secuencias, propiedades fisicoquímicas, estructura y actividad (Kapoor P. et al., 2012. Tumor HoPe: A database of tumor homing peptides. PLoS ONE 7(4): e35187).

A su vez, para el control de insectos nocivos se han desarrollado moléculas que afectan diversos tejidos y funciones. Algunas especies de insectos de importancia médica o económica han desarrollado resistencia a la mayoría de las clases de compuestos químicos. Por ejemplo, para el caso del control de larvas de insectos de importancia en salud pública se han desarrollado productos basados en bacterias, entre los más conocidos se encuentran los productos biológicos basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria produce varias toxinas de carácter proteico que tienen como blanco las células del intestino medio de larvas de insectos de diferentes órdenes, pero fundamentalmente de larvas de insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera. Dentro de los dípteros, las toxinas de esta bacteria tienen actividad contra especies de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, especies que transmiten un gran número de enfermedades (Bravo A. et al. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem. Mol. Biol. 41(7): 423-431).

A la fecha se han descrito fundamentalmente tres mecanismos de acción de estas toxinas insecticidas: lisis coloido-osmótica, el modelo de unión secuencial y el modelo de señalización (Revisado por Vachon V. et al. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. J. Invertebr. Pathol. May 19. [Epub ahead of print]).

Se ha demostrado que la horquilla $\alpha 4$ - $\alpha 5$ de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*, activa contra insectos lepidópteros, es la región que se inserta en la membrana, ambas hélices revisten el lumen del poro (Gerber D. and Shai Y. 2000. Insertion and organization within membranes of the delta-endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. J. Biol. Chem. 275: 23602-23607).

Adicionalmente, se ha encontrado que la horquilla formada por las hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$ de la toxina Cry4B, tóxica para larvas de mosquitos, permeabiliza liposomas unilamelares (Leetachewa S. et al. 2006. Novel preparation and characterization of the $\alpha 4$ -loop- $\alpha 5$ membrane-perturbing peptide from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba δ -endotoxin. J. Biochem. Mol. Biol. 39: 270-277). Mientras que la evaluación del fragmento formado por las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 5$ de la toxina Cry4B induce la formación de poros selectivos para cationes en bicapas lipídicas planas, lo que sugiere que este

135 fragmento puede formar canales funcionales (Puntheeranurak T. et al. 2004. Ion
channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus*
thuringiensis toxin and its alpha1-alpha5 fragment. Mol. Membr. Biol. 21: 67-74). De
igual manera se ha propuesto que la toxina Cry4A puede formar trímeros por medio de
140 ellas de aproximadamente 20 a 26 Å (Taveecharoenkool T. et al. 2010. Combined
molecular dynamics and continuum solvent studies of the pre-pore Cry4Aa trimer
suggest its stability in solution and how it may form pore. PMC Biophys. 3(1):10).

Recientemente hemos propuesto que el fragmento $\alpha 2$ de la toxina Cry11Bb de *B.*
145 *thuringiensis* serovar. *medellin*, conteniendo parte del péptido BTM-P1, puede
permeabilizar membranas biológicas. Es probable que después de la oligomerización e
inserción de los fragmentos $\alpha 2$ y la horquilla $\alpha 4$ - $\alpha 5$ en la membrana, se pueda promover
la internalización de fragmentos cargados positivamente, como el BTM-P1, al interior
de la célula y causar permeabilización de otras membranas citoplasmáticas, incluyendo
150 las de las mitocondrias (Arias M. et al. 2009. Potential dependent permeabilization of
plasma membrane by the peptide BTM-P1 derived from the Cry11Bb1 protoxin.
Biochim. Biophys. Acta. 1788(2): 532-537).

3. Breve descripción de las figuras

155

Fig. 1. Influencia de los péptidos BTM-P4 y BTM-P1 sobre potencial de la membrana
interna mitocondrial monitoreado por la sonda potencial-dependiente safranina O (a,b),
y sobre hinchamiento de mitocondrias de hígado de ratas, monitoreado por la dispersión
de la luz (c, d). Mitocondrias (0.5 mg/ml proteína) fueron añadidas al medio KNPE con
160 succinato 2.5 mM y safranina O 10 μ M; a,c- péptido 0.5 μ M; b,d- péptido 1.0 μ M.

Fig. 2. Influencia de los péptidos BTM-P4, BTM-P4d, BTM-P1 y BTM-P1d sobre la
fluorescencia de los NAD(P)H mitocondriales (a, c) e hinchamiento de mitocondrias de
hígado de ratas (b, d). Mc - mitocondrias (proteína 0.5 mg/ml) fueran añadidas al medio
165 SKPH. Suc. -succinato 2.5 mM.

Fig. 3. Influencia de los péptidos BTM-P4 y BTM-P1 sobre la fluorescencia de los
NAD(P)H en homogenizado de intestino de larvas (LMH). El homogenizado LMH

170 equivalente a 12 intestinos fue añadido a 1 ml de medio SKPH. Suc. - succinato 2.5 mM; FCCP – FCCP 1 μ M; CN – KCN 0.5 mM; BTM-P4 - BTM-P4 1 μ M; BTM-P1 - BTM-P1 1 μ M.

175 Fig. 4. Influencia de los péptidos BTM-P4 y BTM-P1 sobre la fluorescencia de la sonda potencial-dependiente DiSC₃(5) y dispersión de la luz en la suspensión de glóbulos rojos normales y en la presencia de la valinomicina. RBC – glóbulos rojos (0.2% hematocrito) fueron añadidos al medio de NaCl 150 mM, KCl 0.1 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, y DiSC₃(5) 2 μ M. Val – valinomicina 1 μ M.

180 4. Breve descripción del invento

La presente invención se refiere a una nueva clase de péptido catiónico, que posee actividad antimicrobiana, ionofórica, antitumoral e insecticida. El péptido de la presente invención presenta la secuencia de aminoácidos IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS (SEQ ID No. 1: BTM-P4), bien sea construido completa o parcialmente con aminoácidos en configuración estereoquímica D o configuración estereoquímica L, o combinaciones de éstas. La invención muestra un método para causar el hinchamiento de mitocondrias de hígado de rata y de intestino de larvas de mosquito en presencia de diferentes cationes. Por otro lado, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos, incluyendo hongos filamentosos y levaduras, células tumorales y además ensayos donde se demuestra la actividad insecticida, por medio del contacto directo de los organismos con la cantidad inhibidora efectiva del péptido. La presente invención también proporciona secuencias de nucleótidos (SEQ ID No. 2: BTM-P4gb: ATTGCGCCGGCGCTGATTGCGGTGGCGCCGATTGCGAAATATCTGGCGACC
195 GCGCTGGCGAAATGGGCGCTGAAACAGGGCTTTGCGAAACTGAAAAGC; SE Q ID No. 3: BTM-P4gp: ATTGCTCCGGCTCTGATTGCTGTGGCTCCGATTGCUAAATATCTGGCTACCG CTCTGGCTAAATGGGCTCTGAAACAGGGCTTTGCTAAACTGAAAAGC; y SEQ ID No. 4: BTM-P4ga: 200 ATAGCTCCTGCTCTTATAGCTGTTGCTCCTATAGCTAAAGTTCTTGCTACTGC TCTTGCTAAATGGGCTCTTAAACAGGGTTTCGCTAAACTTAAATCC) que codifican la secuencia SEQ ID No. 1, y podrían ser expresados en microorganismos,

plantas y animales recombinantes o transgénicos junto con secuencias de ADN reguladoras y vectores adecuados para su expresión, con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos, células tumorales, matar insectos y aplicaciones en terapia génica.

5. Descripción detallada de la invención

El péptido sintético BTM-P4 de la presente invención está compuesto de 33 aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS (SEQ ID No. 1: BTM-P4), donde los aminoácidos pueden estar completa o parcialmente en la configuración D o L, o cualquier combinación de éstos. La existencia natural de estos péptidos en microorganismos, plantas o animales no ha sido reportada en la literatura científica o en patentes de invención. Los datos que se suministran indican que el péptido BTM-P4 son un nuevo factor ionofórico, bactericida, fungicida, antitumoral e insecticida. Por su probada actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, antifúngica, antitumoral e insecticida, junto con su actividad ionofórica en mitocondrias, el péptido BTM-P4 se constituye como un péptido ionofórico, antimicrobiano, antitumoral e insecticida.

El término "ionofórico" se refiere a que el péptido de la presente invención puede permeabilizar membranas biológicas o artificiales. Los términos "antimicrobiano", "antitumoral" e "insecticida" se refieren a que el péptido puede inhibir, prevenir o destruir el crecimiento o proliferación de los microorganismos, células tumorales e insectos, aquí presentados, entre otros.

El péptido BTM-P4 tiene carácter anfipático lo cual les permite formar una estructura helicoidal cuando se une al ambiente hidrofóbico de las membranas biológicas. La carga catiónica (positiva) del péptido BTM-P4 está determinada por los aminoácidos localizados en las posiciones 13, 21, 25, 30 y 32, por lo tanto, el total de carga positiva es de "más cinco" (+5). En este péptido (BTM-P4), los residuos de aminoácidos 3, 10, 14, 17, 26, 27 y 33 son hidrofílicos, mientras que los residuos de aminoácidos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 28, 29 y 31 son hidrofóbicos, siendo el porcentaje de hidrofobicidad de 63%. El peso molecular de dicho péptido es 3426.234

Daltons; el índice de Boman es de -0.85 kcal/mol y contiene 15 aminoácidos hidrofóbicos en la misma superficie.

240 El término "contacto" mencionado en la sección de ensayos antimicrobianos, antitumorales e insecticidas, hace referencia a la exposición de los organismos a los péptidos, de manera que éste efectivamente permeabilice la membrana externa de las bacterias gram-negativas, gram-positivas, hongos filamentosos, levaduras y células tumorales, matándolas, así como la exposición de las células epiteliales del intestino medio de las larvas de insectos. El contacto puede ser *in vitro*, por ejemplo por la
245 adición del péptido a cultivos celulares para probar la susceptibilidad de las células al péptido, o *in vivo*, para demostrar la actividad de los péptidos en los insectos.

Ejemplos de bacterias que pueden morir o inhibir su crecimiento mediante el péptido BTM-P4 incluyen: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*
250 *faecalis*, *Ralstonia solanacearum*, entre otros. Ejemplos de hongos que pueden morir o inhibir su crecimiento mediante el péptido BTM-P4 incluyen: *Fusarium oxysporum* y *Candida albicans*. Ejemplos de células tumorales que pueden morir o inhibir su crecimiento mediante el péptido BTM-P4 incluyen: Jurkat y U937. Ejemplos de insectos que pueden morir o inhibir su crecimiento mediante el péptido BTM-P4
255 incluyen: *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

De acuerdo con los datos presentados más adelante, el péptido designado como BTM-P4 puede contactar células bacterianas, fúngicas, tumorales y de insectos y matarlas debido a un incremento en la permeabilidad de sus membranas. Las células incluyen
260 tanto microorganismos gram-positivos como gram-negativos, hongos filamentosos, insectos y células tumorales.

El péptido BTM-P4 tiene 33 aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS (SEQ ID No. 1: BTM-P4), los
265 aminoácidos pueden estar completa o parcialmente en configuración D o L, o cualquier combinación de éstos, donde al menos una porción podría alinearse en una conformación de alfa hélice. El péptido tiene una porción sustancialmente hidrofílica con una carga positiva y otra sustancialmente hidrofóbica. El péptido puede adoptar una conformación de alfa-hélice en un medio de hidrofobicidad creciente y en el medio

270 hidrofóbico de una membrana artificial. La conformación puede tener una cara predominantemente hidrofóbica a lo largo de la estructura helicoidal e hidrofílica en la opuesta. El péptido muestra actividad ionofórica en mitocondrias de hígado de rata y en homogenizado de intestino de larvas de mosquito. Esta actividad es comparable con la de valinomicina, un antibiótico selectivo para K^+ usado en muchos estudios y FCCP
275 (uno de los protonóforos clásicos).

La expresión "derivados de los mismos" hace referencia, como es bien sabido en el área técnica a la cual pertenece la presente invención, al hecho que pueden llevarse a cabo sustituciones menores de aminoácidos de los péptidos que no afectan o no afectan
280 sustancialmente la función del péptido aquí mencionados. Tales sustituciones pueden ser llevadas a cabo mediante procedimientos bien conocidos por la persona versada en la materia. Así, todos los péptidos que tengan sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos con una homología de al menos 90% y sustancialmente la misma actividad antimicrobiana, antitumoral, insecticida y/o ionofórica, están dentro del alcance de esta
285 invención. Igualmente, todos los genes que tengan secuencias de nucleótidos y que sustancialmente codifiquen para la misma secuencia del péptido BTM-P4 SEQ ID: 1, y que este tenga sustancialmente la misma actividad antimicrobiana, antitumoral, insecticida e ionofórica, están dentro del alcance de esta invención.

290 Dentro del alcance de la presente invención también están las sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos de esta invención. Tales sales son formadas por métodos bien conocidos por la persona versada en la materia. Así, cuando en la presente solicitud se emplee el término péptido, se pretende indicar que el mismo también incluye tanto los derivados como las sales farmacéuticamente aceptables del péptido, en su configuración
295 completa o parcialmente D o L o cualquier combinación de las mismas.

Así mismo, el péptido de la presente invención puede ser formulado para su uso en medicina humana, veterinaria o en agricultura, para uso profiláctico o terapéutico. Las composiciones farmacéuticas que incluyen el péptido de la presente invención pueden
300 ser administradas por vía oral, rectal y parenteral, eligiendo en cada caso los vehículos o transportadores farmacéuticamente aceptables más adecuados dependiendo de la forma de dosificación elegida. La administración puede ser también por vía tópica. Ejemplos

de formulaciones del péptido pueden ser tabletas, grageas, suspensiones orales, suspensiones inyectables, soluciones inyectables, entre otros.

305

Así mismo, el péptido de la presente invención puede ser empleado mediante la síntesis de genes artificiales que codifiquen para el péptido de esta invención y que sean expresados por medios ampliamente conocidos. Con respecto al término "expresión de genes ampliamente conocidos", es bien sabido en el área técnica a la cual pertenece la presente invención, que pueden llevarse a cabo sustituciones de nucleótidos de los genes artificiales que no afectan o no afectan sustancialmente la expresión de los péptidos aquí mencionados. Tales sustituciones pueden ser llevadas a cabo mediante procedimientos bien conocidos por personas versadas en la materia. Así, todos los genes que tengan sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos y su expresión demuestre sustancialmente la misma actividad antimicrobiana, antitumoral, insecticida o ionofórica, están dentro del alcance de esta invención.

Para que la invención aquí descrita se pueda entender completamente, se ilustran los siguientes métodos y ejemplos. Debe entenderse que estos métodos y ejemplos tienen el único propósito de ser ilustrativos y no para ser interpretados de ninguna manera como limitantes de esta invención.

Ejemplos y métodos

Ejemplo 1. Síntesis química del péptido.

El péptido se sintetizó en fase sólida (Merrifield B. 1963. Solid phase peptide synthesis, Journal of the American Chemical Society. 85:2149-2154; 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 amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:5131-5135), con buenas prácticas de manufactura (GMP). Se utilizó una resina p-metil-benzhidrilamina (MBHA) (0,7 meq/g) y aminoácidos t-boc (Bachem, EE.UU.) en el proceso descrito en Andreu D. 1983. Solid-phase synthesis of Cecropin A and related peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6475-6479. Una vez sintetizado, el péptido se extrajo con 10% de ácido acético y agua. El péptido fue

purificado por HPLC en fase reversa y se analizó por MALDI-TOF. El péptido se disolvió en agua bi destilada a 1 mg/ml y se liofilizó.g

Ejemplo 2. Síntesis del péptido por biotecnología.

340 Una vez determinada la secuencia genética que codifica para el péptido de la invención, la secuencia completa de nucleótidos fue sintetizada e integrada en un vector de expresión, el cual se usa para la transformar la bacteria *Escherichia coli*. Para la selección de las bacterias transformadas se realiza un cultivo en agar LB suplementado con antibióticos. La transformación de las colonias sobrevivientes se confirma
345 mediante la técnica de PCR. Para la expresión del gen, el vector de expresión se induce con isopropil-b-d-thio-galactopyranoside (IPTG). El péptido se purifica del sobrenadante mediante columnas cargadas con Ni^{2+} . La secuencia de aminoácidos se confirmada con análisis de espectrometría de masas. El protocolo empleado es similar al realizado por Tapia y sus colaboradores (Tapia E, Montes C, Rebufel P, Paradela A,
350 Prieto H, Arenas G. 2011. Expression of an optimized *Argopecten purpuratus* antimicrobial peptide in *E. coli* and evaluation of the purified recombinant protein by in vitro challenges against important plant fungi. *Peptides*. 32(9):1909–16).

Ejemplo 3. Determinación secuencias genéticas que codifican el péptido de la invención.

355 Para el diseño de los genes artificiales se realizó una búsqueda bajo el criterio de similaridad de la secuencia del péptido derivado de la toxina Cry11Bb con otros péptidos reportados en la base de datos del NCBI (Genbank), mediante la aplicación BLASTp. De los resultados obtenidos, se seleccionaron 30 secuencias de péptidos con
360 valor $e < 0.7$, los cuales fueron agrupados según su grupo taxonómico (bacterias, plantas y animales), con el fin de determinar los patrones de uso del codón entre ellos, para lo cual se utilizó el software Mega 5.0 (Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599). Para la construcción de la
365 secuencia genética se eligieron los codones de mayor frecuencia por aminoácido entre cada grupo taxonómico.

Método 1. Aislamiento de mitocondrias.

370 Las mitocondrias de hígado de ratas macho Sprague Dawley (4-6 meses de edad, sin
alimentar durante la noche) fueron aisladas por el método de centrifugación diferencial
(Lemeshko V.V., Kugler W.2007. Synergistic inhibition of mitochondrial respiration by
anticancer agent rucyl phosphohomocholine and cyclosporin A. J. Biol. Chem. 282:
37303-37307). El sacrificio de los animales se realizó de conformidad con los principios
375 esbozados en la Guía para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio publicado por
los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. (NIH Publication No. 85-23, revisada en
1996) y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia,
seccional Medellín. El hígado se enfrió previamente durante 4-5 minutos y se
homogenizó en un medio que contenía manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, $MgCl_2$ 2,5
380 mM, EGTA-KOH 1 mM, albúmina de suero bovino BSA (ácidos grasos libres) 0,3
mg/ml, Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2, a 0-4°C. El primer sedimento mitocondrial se
resuspendió en un medio que contenía manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EGTA-
KOH 50 mM, BSA 0,3 mg/ml y Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2, y las mitocondrias se
sedimentaron de nuevo. Este procedimiento de lavado de mitocondrias se repitió una
385 vez más y las mitocondrias finalmente se resuspendieron en 1 ml del mismo medio sin
BSA. El contenido de proteína fue evaluado por un ensayo volumétrico rápido
(Lemeshko V.V., Kugler W.2007. Synergistic inhibition of mitochondrial respiration by
anticancer agent rucyl phosphohomocholine and cyclosporin A. J. Biol. Chem. 282:
37303-37307), teniendo la concentración media de proteína en la mitocondria
390 precipitado igual a 200mg/ml, determinada por este protocolo por el método de Biuret
con BSA como estándar.

Método 2. Aislamiento de glóbulos rojos de ratas

395 Los glóbulos rojos se aislaron como se describe en Raghuraman H., Chattopadhyay A.
2005. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. Chem. Phys.
Lipids 134: 183-189, con ligeras modificaciones. Aproximadamente 5 ml de sangre de
rata fueron mezclados con 20 ml de una solución compuesta de NaCl 120 mM,
EDTA 10 mM, citrato de sodio 5 mM, y Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, y fue centrifugada a
400 3000 rpm durante 10 minutos (centrífuga Jouan RM 1812). El sedimento se lavó tres
veces mediante resuspensión suave del sedimento de células en 20 ml de NaCl (150
mM), Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, y posteriormente centrifugación a 3000 rpm durante 10

25
min. El sedimento final se resuspendió en el mismo medio suplementado con glucosa 10 mM a un hematocrito final de 20%.

405

Método 3. Monitoreo de potencial de membrana interna de mitocondrias

El potencial de la membrana interna de las mitocondrias de hígado de rata fue monitoreado por la sonda fluorescente safranina O potencial-sensible (520 nm de excitación, fluorescencia de 580 nm) como se describe en Wieckowski M.R., Wojtczak L. 1998. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. FEBS Lett. 423: 339-342, utilizando un espectrofluorímetro Aminco-Bowman Series 2. Las mitocondrias, a una concentración de 0,5 mg de proteína/ml, se añadieron al medio de incubación KNPE 410 compuesto de KNO₃ 150 mM, fosfato inorgánico 5 mM, EGTA 20 µM, pH 7,2, 415 suplementado con succinato 5 mM y safranina O 10 µM.

Método 4. Monitoreo de estado redox de los piridin-nucleótidos mitocondriales

420 El nivel de formas reducidas de piridin-nucleótidos endógenos, NAD(P)H, en mitocondrias aisladas de hígado de rata u homogeneizados de intestino de larvas, se monitoreó fluorimétricamente (450 nm fluorescencia) utilizando un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Series 2. Para reducir al mínimo la influencia de la dispersión de la luz en las mediciones de fluorescencia y para disminuir el efecto del 425 filtro interno, los haces de luz excitantes y emisores se centraron en la esquina de la cubeta de 1,5 x 1,5 mm como se describe en Lemeshko V.V., Haridas V., Quijano Perez J.C., Gutterman J.U. 2006. Avicins, natural anticancer saponins, permeabilize mitochondrial membranes. Arch. Biochem. Biophys. 454: 114-22, y se seleccionó la longitud de onda de excitación de 365nm, en lugar de 340nm. Se añadieron las 430 mitocondrias a una concentración final de 0,5 mg de homogenizado de proteína/ml, o de larva en un equivalente de 12 larvas/ml, a los medios de incubación compuestos de sacarosa 100 mM, KCl 75 mM, fosfato inorgánico 10 mM, HEPES 5 mM, EGTA 50 µM, pH 7,2 (medio SKPH). La caída de potencial de la membrana interna, como resultado de permeabilización mitocondrial por los péptidos o por un desacoplador, se mostró 435 como una disminución de la fluorescencia de NAD(P)H debido a oxidación acelerada de los nucleótidos de piridina.

Método 5. Monitoreo de potencial de la membrana plasmática de glóbulos rojos

440 El potencial de la membrana plasmática de los glóbulos rojos se monitoreó con la sonda fluorescente DiSC₃(5) potencial sensible (Parker J.C., Castranova V. 1984. Volume-responsive sodium and proton movements in dog red blood cells. J. Gen. Physiol. 84: 379-401). Se usaron dos tipos de medio de incubación: el medio de NC que contiene NaCl 150 mM, KCl 0,1 mM, HEPES-NaOH 5 mM, pH 7,2, y el medio NS que contiene
445 NaCl 63 mM, KCl 0,1 mM, sacarosa 125 mM, HEPES-NaOH 5mM, pH 7,2. Los glóbulos rojos se añadieron con un hematocrito final de 0,2%. Ambos medios fueron suplementados con DiSC₃(5) a una concentración final de 2 µM. La captura de esta sonda catiónica de potencial dependiente por los glóbulos rojos, llevó a una disminución de la intensidad de fluorescencia (648nm de excitación, 668nm de fluorescencia). Para
450 generar artificialmente un potencial de membrana relativamente alto, se añadió valinomicina 1µM a la suspensión de glóbulos rojos. El péptido se añadió a la suspensión de los glóbulos rojos normales, o a los glóbulos rojos pre-incubados con valinomicina.

455 Método 6. Observación de hinchamiento mitocondrial y contracción-hinchamiento de glóbulos rojos

El hinchamiento mitocondrial se monitoreó simultáneamente con la NAD(P)H o con fluorescencia de safranina O, utilizando un soporte modificado de la cubeta (Lemeshko
460 V.V., Haridas V., Quijano Perez J.C., Gutterman J.U.2006. Avicins, natural anticancer saponins, permeabilize mitochondrial membranes. Arch. Biochem. Biophys. 454: 114-22), para el espectrofluorímetro Aminco-Bowman Series 2. Uno de los dos canales auxiliares de este equipo permite la medición de 90 °-dispersión de la luz emitida por un infrarrojo diodo emisor de luz (920 nm). La luz dispersada fue detectada previamente
465 por el fotodiodo y amplificador montado adicionalmente (Lemeshko V.V., Haridas V., Quijano Perez J.C., Gutterman J.U.2006. Avicins, natural anticancer saponins, permeabilize mitochondrial membranes. Arch. Biochem. Biophys. 454: 114-22). De la misma manera, un aumento o disminución de la dispersión de la luz se monitoreó en la suspensión de glóbulos rojos permitiendo la observación de la contracción o
470 hinchamiento celular, respectivamente, como se demostró anteriormente (Lemeshko

27

V.V. 2011. Permeabilization of mitochondria and red blood cells by polycationic peptides BTM-P1 and retro-BTM-P1. Peptides 32: 2010-2020). La dispersión de luz por los glóbulos rojos se monitoreó de forma simultánea con la fluorescencia de DiSC₃(5) como se describió anteriormente.

475

Las muestras se agitaron constantemente con el agitador magnético y se mantuvieron a 30°C. Los datos obtenidos se presentan como el promedio y el error estándar del promedio (SEM).

480 **Método 7. Preparación de homogenizados de intestino de larvas de *Aedes aegypti* y determinación de la actividad del péptido.**

Los intestinos de larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* (200 intestinos en 0.5 ml de sacarosa 100 mM, KCl 75 mM, fósforo inorgánico 10 mM, EGTA 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7.2) fueron homogenizados en un homogenizador Polytron a 30.000 rpm a 0-4 °C. El homogenizado de larvas de mosquito, equivalente a 12 intestinos, se agregó a 1 ml de medio SKPH (Suc.-succinato 2.5 mM; FCCP-1 µM FCCP; CN- KCN 0.5 mM; BTM-P4- BTM-P41 µM; BTM-P1- BTM-P11 µM), y se determinó la influencia de los péptidos BTM-P4 y BTM-P1 sobre fluorescencia de los NAD(P)H.

490

Ensayos de actividad

Ensayos de actividad antimicrobiana.

495 Para evaluar la actividad antibacteriana de las dos formas (forma L y D) del péptido de esta invención se escogieron cepas de bacterias gram-positivas y gram-negativas y de algunos organismos fitopatógenos como *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC 33591), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y un aislamiento de *Ralstonia* sp. Para los ensayos, las bacterias se cultivaron en caldo Tripticase soya 1% (TSB) durante la noche, con agitación, a las temperaturas adecuadas. Al día siguiente se ajustó la densidad óptica (DO) a 600nm entre 0,75 y 0,8 para cada cultivo, correspondientes a aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. A continuación, cada cultivo se diluyó a 1×10^3 o 1×10^5 . Se dispensaron 125 µl de cada cultivo en placas estériles de 96 pozos, se añadieron 50 µl del péptido en

500

505 sus dos formas D y L, a una concentración final de 5 μ M. Las placas se incubaron a la temperatura adecuada (30 o 37°C) durante tres horas. Después de este tiempo se añadieron 120 μ l de TSB 3% a cada pozo y se incubaron de nuevo bajo las mismas condiciones durante 12 horas (Rathinakumar R., Walkenhorst W.F., Wimley W.C. 2009. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. J. Am. Chem. Soc. 131:7609-7617). Se hicieron cuatro repeticiones de cada tratamiento del péptido y además se incluyeron controles del ensayo. Las lecturas se realizaron en un lector de placas de ELISA a 600nm. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de acuerdo con la metodología indicada, mediante el uso de diluciones seriadas de cada péptido en cada microorganismo. La MIC es la concentración más baja de los péptidos que causan un 100% de mortalidad de los microorganismos. Se realizaron cuatro repeticiones en dos ensayos independientes.

Para evaluar la actividad antifúngica se utilizaron cepas de *Candida albicans* y de 520 *Fusarium oxysporum* (ATCC 15648). Para *C. albicans* se usó la misma metodología descrita para las bacterias, excepto que se utilizó como medio de cultivo caldo Sabouraud, 1 y 3%, según el caso (Rathinakumar R., Walkenhorst W.F., Wimley W.C. 2009. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. J. Am. Chem. Soc. 131:7609-7617). 525

Para *F. oxysporum* se obtuvieron cultivos puros en agar dextrosa-papa(PDA), después de esporulación. Se agregaron 5 ml de agua destilada para recoger las esporas por medio de un raspado del cultivo, la suspensión resultante se distribuyó en tubos Falcon con perlas de vidrio estériles y se agitó para liberar las esporas. Posteriormente, la 530 suspensión se hizo pasar a través de un filtro y se determinó la concentración de esporas en una cámara de Neubauer y se diluyeron a una concentración de 1×10^4 conidios por mililitro. Los ensayos se realizaron de la misma forma que con las bacterias y levaduras, pero utilizando como medio de cultivo caldo de Sabouraud en 1 y el 3%. Tanto *C. albicans* como *F. oxysporum* fueron evaluados inicialmente con los péptidos a una 535 concentración final de 5 μ M y se determinó la CMI. Los ensayos se realizaron con cuatro repeticiones, en dos ensayos independientes.

Ensayos de actividad antitumoral.

540

Se utilizó la prueba de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromuro) para medir la muerte celular. Se utilizaron cultivos de células Jurkat y U937 cultivadas en placas de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 5000 células Jurkat y U937. Se añadieron en 90 µl de medio suplementado con FBS al 5% y después de 48 horas

545 durante la fase de crecimiento exponencial, se añadieron diversas concentraciones de las dos formas (formas D y L) del péptido y los cultivos se incubaron durante 20 horas, equivalente a un ciclo celular. Después se agregó a cada pozo 20 µl de MTT (Sigma, 5mg/ml) y se incubaron durante 4 horas en oscuridad. Posteriormente, se añadieron 100 µl de isopropanol ácido para diluir los cristales de formazán formados; se llevó a cabo

550 una agitación adicional durante 4 horas en oscuridad. Por último, se leyó la absorbancia a 570nm utilizando un lector de placas Multi skan Spectrum (Termo Scientific). Se incluyeron controles negativos sin péptidos y controles de solvente (HEPES). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos para hallar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) fueron analizados mediante un análisis Probit usando el

555 programa Statgraphics Centurion.

Ensayos de actividad insecticida.

Las colonias de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* fueron mantenidas en insectario a

560 30°C, con 70-80% de humedad relativa, un fotoperiodo de 12:12 horas luz:oscuridad y alimentadas con dieta artificial. Para el ensayo de actividad insecticida se colocaron diez larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* en cada pozo de una placa de 24 pozos conteniendo 1 ml de agua de cloro. De igual manera se dispusieron larvas de primer estadio de *Anopheles albimanus*. Los péptidos se disolvieron en buffer 100 mM

565 HEPES-Tris con 10% DMSO, pH 7.4. Los tratamientos con las dos formas del péptido (forma D: BTM-P4d y forma L: BTM P4) se aplicaron a una concentración final de 5 µM. Cada tratamiento se realizó con 2 repeticiones. La mortalidad se registró a las 24 horas después del tratamiento. El control negativo se estableció mediante la adición de 10 µl de agua del grifo sin cloro.

570

Otros ensayos.

70

Para evaluar la capacidad ionofórica del péptido BTM-P4, en comparación con el péptido BTM-P1, se usaron mitocondrias de hígado de rata y se monitoreó el potencial de la membrana interna mitocondrial con safranina O, una sonda dependiente de potencial.

Al agregar mitocondrias al medio de incubación que contiene succinato como sustrato de oxidación en la cadena respiratoria, se disminuyó significativamente la intensidad de la fluorescencia de la sonda (Figs. 1, a y b) y en 1 minuto se alcanzó equilibrio osmótico según el cambio en la dispersión de la luz (Figs. 1, c y d). Al agregar BTM-P4 en las concentraciones de 0.5 μ M o 1.0 μ M (Figs. 1, a y b, respectivamente) se observó un incremento rápido de fluorescencia de la sonda, acompañado con hinchamiento de las mitocondrias (Figs. 1, c y d, respectivamente), lo que fue más significativo que lo causado por el péptido BTM-P1 (Fig. 1).

Como hemos demostrado antes, la sonda catiónica-safranina O es capaz de disminuir el efecto de los péptidos policationicos, supuestamente afectando el potencial superficial de las membranas biológicas. Por esta razón, se evaluó la capacidad del péptido BTM-P4, y de su análogo compuesto de aminoácidos D, BTM-P4d, para afectar la fluorescencia de los NAD(P)H de la matriz mitocondrial que depende directamente del potencial de la membrana, o sea sin agregar alguna sonda potencial-dependiente. Los datos obtenidos se presentan en comparación con los efectos causados por los péptidos BTM-P1 y BTM-P1d (Fig. 2). Se puede ver que todos estos péptidos en la concentración de 1.0 μ M permeabilizaban las mitocondrias muy rápidamente, sin alguna diferencia significativa y se revela en una caída brusca de la intensidad de la fluorescencia de los NAD(P)H (Fig. 2, a) y de la dispersión de la luz por el hinchamiento de las mitocondrias (Fig. 2, b).

En la Fig. 3, se puede ver que el péptido BTM-P4 también es capaz de causar disminución de la fluorescencia azul del homogenizado de intestino de larvas del mosquito *Aedes aegypti*, de la misma manera que el FCCP (carbonyl-cyanide-p-trifluoromethoxy pheny lhydrazone) un protonóforo bien conocido, o como el péptido BTM-P1, con la recuperación del nivel de los NAD(P)H luego de agregar el cianuro (CN), inhibidor de la cadena respiratoria, debido a la reducción de los piridin-nucleótidos con sustratos endógenos.

Evaluando la permeabilización de la membrana plasmática con el péptido BTM-P4, hemos encontrado que tanto su forma L (BTM-P4), como la forma D (BTM-P4d), son casi diez veces más activos que los péptidos BTM-P1 o BTM-P1d, y lo más importante es que el efecto de permeabilización es dependiente de manera muy significativa del potencial de la membrana (Fig. 4). En el caso de los glóbulos rojos, el alto potencial de la membrana plasmática (hasta -85 mV) se genera en presencia de valinomicina como fue demostrado antes (Lemeshko V.V. 2011. Permeabilization of mitochondria and red blood cells by polycationic peptides BTM-P1 and retro-BTM-P1. *Peptides* 32: 2010-2020).

Resultados

a- La actividad antimicrobiana se evaluó por medio de ensayos en placas de 96 pozos con bacterias gran-positivas, gran-negativas, levaduras y hongos filamentosos. La forma L del péptido BTM-P4 mostró actividad contra el hongo *Fusarium oxysporum*, con una MIC de 2.5 µM, mientras que la forma D del mismo péptido (BTM-P4d) mostró una MIC de 1.2 µM contra el mismo hongo. El péptido BTM-P4d presentó una MIC de 1.2µM contra la bacteria *Escherichia coli*. La MIC del péptido BTM-P4d contra *Staphylococcus aureus* multiresistente y *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina fue de 2.5 µM. Así mismo, contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* la MIC del mismo péptido fue de 5.0 µM (ver Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del péptido BTM-P4 en sus formas D y L y BTM-P1 contra diferentes microorganismos. Datos de la concentración inhibitoria mínima en µM.

Especie	BTM-P4d (Forma D)	BTM-P4 (Forma L)	BTM-P1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.2	2.5	>5.0
<i>Candida albicans</i>	>5.0	>5.0	>5.0
<i>Staphylococcus aureus</i> MR*	2.5	>5.0	>5.0
<i>Enterococcus faecalis</i> VR**	2.5	>5.0	>5.0
<i>Escherichia coli</i>	1.2	>5.0	>5.0
<i>Ralstonia solanacearum</i>	5.0	>5.0	>5.0

* Multiresistente
** Resistente a Vancomicina

39

b- Para determinar la actividad antitumoral se utilizó la prueba de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-diphenyltetrazoliumbromide) que mide la muerte celular, como se mostró anteriormente (Ensayo de actividad antitumoral). Se utilizaron cultivos de células Jurkat y U937 cultivadas en placas de 96 pozos. Los resultados indican que la forma D del péptido (BTM-P4d) mostró una concentración inhibitoria media de 1.63 µg/ml para las células Jurkat y de 2.03 para las células U937.

c- Actividad insecticida: la forma D del péptido(BTM-P4d) eliminó todas las larvas de los mosquitos de las especies *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* después de 24 horas de exposición, a una concentración de 5 µM, mientras que la forma L del mismo péptido (BTM-P4) solamente eliminó el 45% de las larvas de *Anopheles albimanus* y el 10% de las larvas de *Aedes aegypti* durante el mismo tiempo de exposición y a la misma concentración. (ver Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de los mosquitos *Anopheles albimanus*, primer instar y *Aedes aegypti*, segundo instar, (Diptera: Culicidae), 24 horas después del tratamiento con 5 µM del péptido BTM-P4 en sus formas D y L.

	<i>Anopheles albimanus</i>	<i>Aedes aegypti</i>
BTM-P4d (Forma D)	100	100
BTM-P4 (forma L)	45	10

Los resultados obtenidos permiten concluir que las dos formas del péptido BTM-P4(forma D y L) tienen un gran potencial para permeabilizar membranas de bacterias gran-positivas y gran-negativas, de hongos y levaduras, incluso células tumorales y otros organismos eucarióticos, que se caracterizan por tener potencial de membrana alto. Las formas D o L se pueden usar dependiendo de un objetivo específico, a un tiempo largo o corto, para obtener un efecto relativamente permanente o temporal, como espermicida, antimicrobiano, antiparasitario, insecticida o antitumoral, por ejemplo. De igual manera los productos obtenidos por la expresión de los genes que codifican para el péptido BTM-P4.

SECUENCIAS

SEQ ID No. 1: BTM-P4 en sus formas D y L.
IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS.

670

SEQ ID No. 2: BTM-P4gb:
ATTGCGCCGGCGCTGATTGCGGTGGCGCCGATTGCGAAATATCTGGCGACC
GCGCTGGCGAAATGGGCGCTGAAACAGGGCTTTGCGAAACTGAAAAGC.

675

SEQ ID No. 3: BTM-P4gp:
ATTGCTCCGGCTCTGATTGCTGTGGCTCCGATTGCUAAATATCTGGCTACCG
CTCTGGCTAAATGGGCTCTGAAACAGGGCTTTGCTAAACTGAAAAGC.

SEQ ID No. 4: BTM-P4ga:

680

ATAGCTCCTGCTCTTATAGCTGTTGCTCCTATAGCTAAAGTTCTTGCTACTGC
TCTTGCTAAATGGGCTCTTAAACAGGGTTTCGCTAAACTTAAATCC.

31X

685

REIVINDICACIONES

690

695

700

705

710

1. Un péptido caracterizado por la siguiente secuencia de aminoácidos: IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS (SEQ ID No. 1), o derivados del mismo y sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. El péptido de acuerdo con la Reivindicación 1, caracterizado porque presenta una homología de al menos 90% a la SEQ ID No.1.

3. El péptido de la Reivindicación 1, caracterizado porque todos los aminoácidos que lo componen presentan isomería de tipo L.

4. El péptido de la Reivindicación 1, caracterizado porque todos los aminoácidos que lo componen presentan isomería de tipo D.

5. Una secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido de la Reivindicación 1.

6. La secuencia de nucleótidos de la Reivindicación 5 seleccionada del grupo conformado por SEQ ID No. 2: BTM-P4gb, SEQ ID No. 3: BTM-P4gp y SEQ ID No. 4: BTM-P4ga.

7. Los péptidos de las Reivindicaciones 1 a 4 caracterizados porque presentan actividad ionofórica, antimicrobiana, antitumoral e insecticida.

8. Una formulación farmacéutica que contiene un péptido seleccionado de las Reivindicaciones 1 a 4 y vehículos farmacéuticamente aceptables.

9. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 8 caracterizada porque contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido seleccionado de

715 las Reivindicaciones 1 a 4 que proporciona un efecto seleccionado entre ionofórico, antimicrobiano, antitumoral e insecticida.

10. Una formulación farmacéutica de acuerdo con las Reivindicaciones 8 y 9, en presentaciones adecuadas para administración oral, ocular, tópica, rectal o parenteral.

720

11. Una formulación agrícola caracterizada porque contiene un péptido seleccionado de las Reivindicaciones 1 a 4, junto con un vehículo agricolamente aceptable.

12. Una formulación veterinaria caracterizada porque contiene un péptido seleccionado de las Reivindicaciones 1 a 4, junto con un vehículo veterinariamente aceptable.

725

13. Un vector de expresión caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la Reivindicación 5.

730

14. Una célula hospedera que contiene por lo menos un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 13.

15. El uso del péptido de la Reivindicación 1 para el control de enfermedades infecciosas producidas por hongos y bacterias.

735

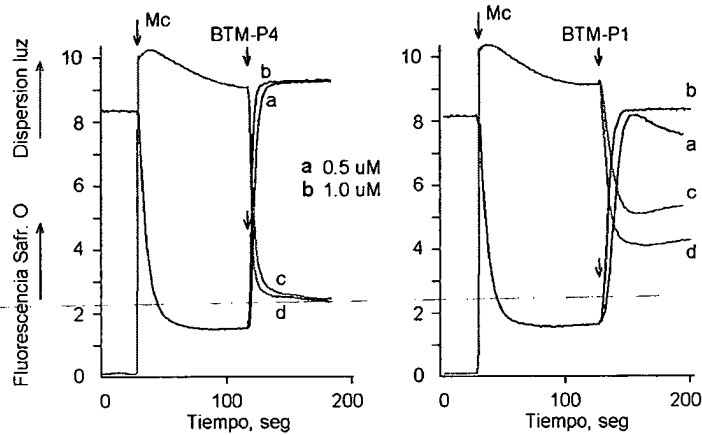
16. El uso del péptido de la Reivindicación 1 para el control de enfermedades cancerosas.

740 17. El uso del péptido de la Reivindicación 1 para el control de insectos.

18. El uso del péptido de la Reivindicación 1 para la fabricación de una formulación farmacéutica, veterinaria o agrícola.

745

Figuras



750

Figura 1

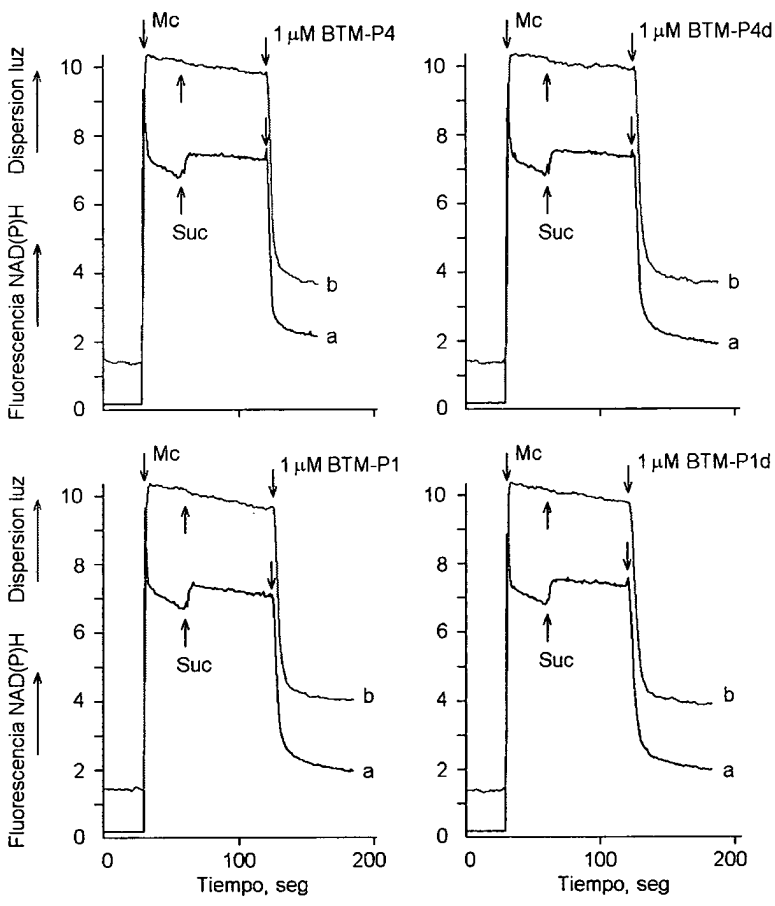


Figura 2.

30
37

755

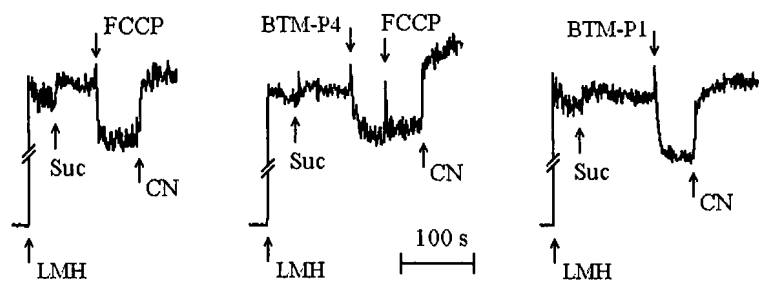


Figura 3.

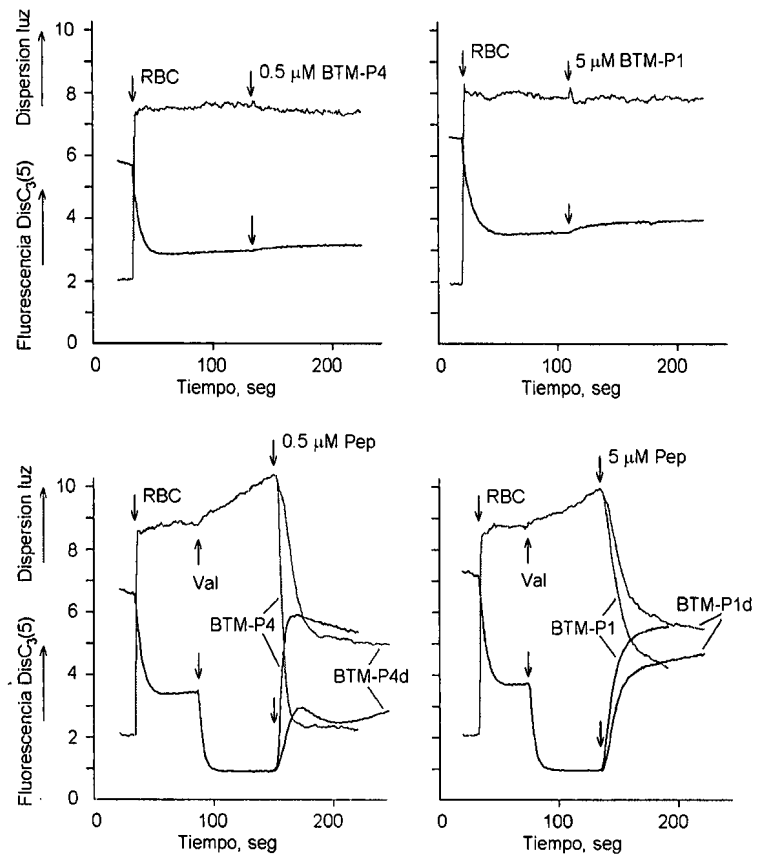


Figura 4

31

3A
38

SOLICITUD	
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
REDUCCIÓN DE TASAS DE SOLICITUD DE PATENTE	
1 APLICACION/A:	
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Presentación solicitud ☐ Examen de patentabilidad ☐ Tasas de mantenimiento	
2 BENEFICIARIO	IDENTIFICACION
Nombre: Universidad Nacional de Colombia Dirección: Carrera 45 No. 26-85 Nacionalidad o Domicilio: Colombia Teléfono: 3165000 Ext. 18022	☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Número: 899999063-3
En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.	
3 Anexos	
Micro, pequeñas y medianas empresas	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea	
☐ Documento de constancia de cumplimiento a lo establecido en la Ley 905 de 2004	
Universidades públicas o privadas	
☒ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia del registro vigente en Cámara de Comercio	
4 Solicito la reducción de la tasa de patente.	
Nombre: 	
Firma: 	
C.C. _____ TIP _____	
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página	

CÓMO DILIGENCIAR LA SOLICITUD DE REDUCCIÓN DE TASAS DE REGISTRO DE PATENTES

1. Aplicación a: Debe marcarse en la casilla correspondiente si se trata de Patente de Invención o Patente Modelo de Utilidad

En caso de patente de invención, la reducción de tasas aplica para la presentación de la solicitud, examen de patentabilidad y las tasas de mantenimiento (anualidades)

En caso de patente de modelo de utilidad la reducción de tasas aplica para la presentación de la solicitud y el examen de patentabilidad.

2. Beneficiario: Persona natural o jurídica que está solicitando el registro de la patente. Debe indicarse nombre, dirección, nacionalidad o domicilio y teléfono.

Identificación: Corresponde a la indicación del documento de identidad del solicitante discriminando en la casilla correspondiente si se trata de C.C (cédula de ciudadanía), NIT (número de identificación tributaria), C.E (cédula de extranjería); u otro (en caso de que la identificación del solicitante corresponda a un documento diferente a los anteriores).

Domicilio: Indicar el país o estado, departamento y ciudad.

3. Anexos: Deben marcarse con una X las casillas correspondientes a los documentos que acompañan la solicitud

4. Firma: Si actúa directamente una persona jurídica, la firma deberá ser la de su representante legal y si actúa una persona natural, ésta deberá firmar la solicitud.

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☒	Indicación que se solicita 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 (De ser el caso formato de descuento)
☒	Completa ☐
	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
☐	Completa ☐
	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
☐	Completa ☐
	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-016116-00000-0000

Fecha: 2013-01-29 13:51:17 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 2 PATENTES Eve. 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3738

PI02-F08 (2009-11-18)