

Doctora
MARIA JOSÉ LAMUS BECERRA
Directora de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
Bogotá, D.C.

ASUNTO: RESPUESTA A REQUERIMIENTO EXAMEN DE FONDO
SOLICITANTE: UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
EXPEDIENTE: NC2017/0006068

De manera respetuosa y atenta nos permitimos dar respuesta a las objeciones realizadas por el Examinador en oficio No. 8028 de 12 de agosto de 2019 respecto al título, a las reivindicaciones, novedad y nivel inventivo con los siguientes argumentos técnicos y modificaciones al capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente NC2017/0006068.

3. RESPECTO DE LA SOLICITUD DE LA PATENTE:

3.1. Título

Con respecto a la recomendación de la modificación del título “PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS MODIFICADOS DE OXYSTERLINAS SECRETADAS POR EL ESCARABAJO COPRÓFAGO OXYSTERNON CONSPICILLATUM” se cambia por “**PÈPTIDOS ANTIMICROBIANOS MODIFICADOS DE OXYSTERLINAS DEL ESCARABAJO COPRÓFAGO OXYSTERNON CONSPICILLATUM**”.

3.2. Reivindicaciones

- **Reivindicación 1**

Se modificó la reivindicación No. 1 eliminando el último renglón “*n* tiene entre 5 y 8 residuos de H”, quedando de la siguiente forma:

1. Péptido antimicrobiano modificado **caracterizado porque** comprende la fórmula I:

GSKRWRKFEKX₁₁VKX₁₄KX₁₆X₁₇EX₁₉TKEALPVX₂₇X₂₈X₂₉VX₃₁X₃₂VX₃₄X₃₅X₃₆VG
RX₄₀

donde:

- X₁₁ es seleccionado entre R, K, Q, N
- X₁₄ está ausente, o es KALEDAKEKLQEERVQ
- X₁₆ es seleccionado entre I, V, L, M, F, A
- X₁₇ es seleccionado entre F, V, L, I, A
- X₁₉ es seleccionado entre E, H
- X₂₇ es seleccionado entre V, I, L, M, F, A
- X₂₈ es seleccionado entre Q, K, N
- X₂₉ es seleccionado entre G, A,
- X₃₁ es seleccionado entre V, A, L, I
- X₃₂ es seleccionado entre A, T

X₃₄ es seleccionado entre A, V, L, I

X₃₅ es seleccionado entre T, G,

X₃₆ es seleccionado entre A, V, L, I

X₄₀ está ausente, o es R

Dicha expresión se eliminó para obtener mayor claridad con respecto a que no se está solicitando la protección de un método de purificación existente en el estado de la técnica que utiliza la cola de polihistidina.

- **Reivindicación 2**

De conformidad con lo establecido por el examinador a lo largo del escrito, se ajustó la reivindicación 2 de la siguiente forma:

2. Péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende:

- a) Aminoácidos seleccionados del grupo: L-aminoácidos, D- aminoácidos, o mezclas de éstos y modificaciones como fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, ciclación, modificación de grupos funcionales, introducción de aminoácidos no naturales, unión a moléculas radioactivas, fluorescentes, complejos metálicos, nano partículas, o mezclas de éstos.
- b) Las modificaciones generan propiedades del péptido modificado en rangos de hidrofobicidad neta entre 30 – 50%, punto isoelectrico entre 8 – 11, ángulos de hidrofobicidad entre 80-160°.

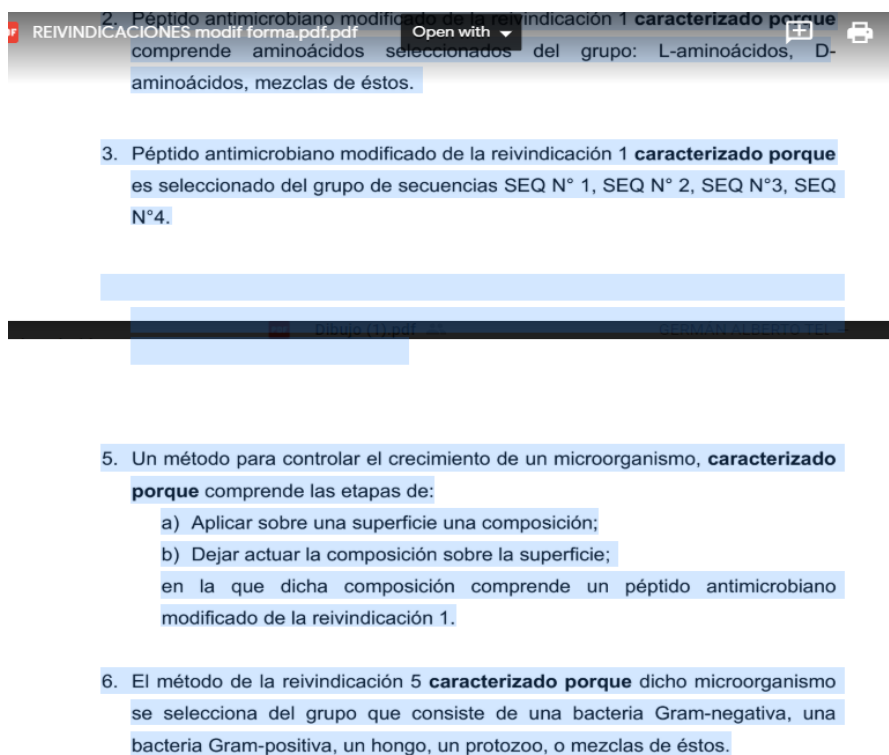
Teniendo en cuenta que la reivindicación No. 2 tal y como estaba redactada tenía un margen de aplicación demasiado amplio, se considera necesario restringir y aclarar los tipos y los rangos específicos de modificación del péptido.

- **Reivindicación 3**

Teniendo en cuenta observaciones del Examinador (ver ítem 4 nivel inventivo) se elimina la reivindicación 3

- **Reivindicación 4**

Respecto a la corrección de la numeración del capítulo reivindicatorio se encuentra que el documento tiene un error de configuración en donde la reivindicación 4 se encuentra en el documento, pero oculta entre las páginas 1 y 2, tal y como se observa a continuación:



Por tanto, al realizar con el teclado la operación ctrl+c y ctrl+v se evidencia la reivindicación correspondiente al numeral 4, con el texto que sigue a continuación:

4. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Teniendo en cuenta la reenumeración pasa a ser la reivindicación 3.

- **Reivindicación 5:**

Acogiendo la observación del señor examinador se hacen las precisiones correspondientes en dicha reivindicación de la siguiente forma:

4. Un método para aplicar el péptido de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado porque** comprende las etapas de:
 - a) Aplicar o integrar el péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 y 2 en un rango de concentración entre 3 – 100 µg/ml; mezclado o integrado sobre una matriz, polímero, gel, película, nano-partículas, compuesta por moléculas orgánicas o inorgánicas.
 - b) Dejar actuar la composición en un espacio, superficie y/o fluido de forma que el péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 tenga actividad biológica, antimicrobiana, cicatrizante, inmunomoduladora, neutralización de Lipopolisacárido, angiogénica, quimiotáctica, antitumoral, anti-sepsis

- **Reivindicación 6:**

Teniendo en cuenta observaciones del Examinador (ver ítem 4 nivel inventivo) se elimina la reivindicación 6

Por tanto, teniendo en cuenta los anteriores ajustes se anexará nuevamente el capítulo reivindicatorio.

1. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

El examinador manifiesta que “El documento D1 divulga un péptido sintético (Oxysterlina 1) el cual inhibe el crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ESBL y *Salmonella typhi* (Pág. 19, col. Der. Párr.12, col. izq. párr. 1).”

Se aclara que en el mismo trabajo se difunde la secuencia del péptido nativo proveniente del transcriptoma del escarabajo cuya secuencia no es posible patentar dado que se encuentra en la naturaleza, más no, las posibles modificaciones las cuales se están solicitando acorde a la reivindicación 2.

Así mismo, respecto al documento D1 el examinador lo considera como:

[...] el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga un péptido sintético modificado de oxysterlinas secretadas por el escarabajo coprófago *Oxysternon Conspicillatum* (Oxysterlina 1) (Diap.4), el cual posee actividad antimicrobiana (Pág. 19, columna 2, Párr.12, columna 1, Párr. 1, diaps. 17 y 18), este documento también divulga que el péptido sintético modificado escapaz de inhibir el crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ESBL y *Salmonella typhi* (Pág. 19, columna 2, Párr.12, columna 1. Párr. 1).

Se aclara que el documento D1 no divulga un péptido sintético modificado de oxysterlinas secretadas por el escarabajo coprófago *Oxysternon conspicillatum*, sino que se presenta la secuencia natural sin ninguna modificación.

Respecto a la siguiente frase: “adicionalmente, el documento D1 menciona la composición del péptido maduro, el cual puede contener L-aminoácidos o D-aminoácidos (Diap. 13) [...]”, se aclara que en el documento D1, en ninguna de las diapositivas de la presentación, se induce a pensar en modificaciones ni se presentan alteraciones diferentes a la secuencia del péptido natural.

Por otro lado, sobre lo que expresa el examinador de que el documento D2 “divulga un método de purificación el cual involucra el uso de una etiqueta de polihistidinas, fusionada a un péptido o a una proteína de interés (Pág. 1,párr.1). Las etiquetas de polihistidinas pueden ser daptadas tanto en el N como en el C-terminal de la proteína recombinante (Pág. 1, párr.4).”; se reconoce que dicho tag de purificación hace parte del estado de la técnica y no se está solicitando reivindicación sobre este método de purificación en términos generales. Con base en lo anterior se eliminará del texto de la descripción “el extremo C-terminal del péptido, una cola de histidinas”.

2. EXAMEN DE PATENTABILIDAD – NIVEL INVENTIVO

El examinador manifiesta que:

La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y el péptido antimicrobiano modificado divulgado en el documento D1 consiste en los residuos de histidina hacia el extremo C-terminal

No se evidencia un efecto técnico asociado a incluir los residuos de histidina hacia el extremo C-terminal del péptido, porque tanto la Oxysterlina 1 de la solicitud como la Oxysterlina 1 del documento 1 presentan la misma actividad antimicrobiana hacia bacterias resistentes a múltiples fármacos, a saber, *E. coli* ATCC35218, *E. coli* ESBL, *E. cloacae*, y *Salmonella typhi*; con concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1,42 2,84 µM (6,25 a 12,5 µg/mL) (Pág. 10, Ln.5-10, Tab. 1).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el péptido antimicrobiano conocido en el documento D1 con el fin de obtener un péptido antimicrobiano alternativo?

Para aclarar, en el documento D1 nunca se trabajó con un péptido modificado en residuos histidina hacia el extremo C-terminal, por lo tanto, no existe evidencia experimental de que el péptido de la reivindicación 1 de la solicitud como la Oxysterlina 1 del documento D1 presenten la misma actividad.

En conclusión, el péptido antimicrobiano que se pretende patentar es diferente al conocido en D1 puesto que las modificaciones generadas al péptidos natural a nivel de la secuencia de aminoácidos varía en las posibilidades que se describen en la reivindicación 1, 2 y 3 que permiten, una mayor actividad y espectro antimicrobiano, mayor estabilidad en suero para evitar degradación por proteasas, menor toxicidad, entre otras.

Frente al argumento del examinador:

Sin embargo, el incluir residuos de histidina hacia el extremo C-terminal del péptido, ya está divulgado en el documento D2 que se refiere al uso de etiquetas de polihistidina adaptadas en el N o C- terminal para la purificación de proteínas recombinantes (Pág. 1, Párrs. 1, 2 y 4).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia, estaría motivada a incluir residuos de histidina en el extremo C-terminal, tal y como se describe en el documento D2, en el péptido antimicrobiano del documento D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. Por lo cual se considera obvia.

Se aclara nuevamente que se modificó la reivindicación 1 y la descripción de la invención para eliminar las secuencias de polihistidinas adaptadas al extremo N o C- Terminal. Se resalta que las modificaciones al péptido de la reivindicación 1 se describen en las reivindicaciones 2 y 3.

En la descripción de la invención se aclara los siguientes ítems (pag9):

La invención proporciona estrategias de aplicación para usar los péptidos con sus diversas actividades biológicas como inmunomoduladoras, inductores de la migración celular, anti endotoxina, angiogenicos y antitumorales.

Usos de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos fueron ensayados en su capacidad para neutralizar lipopolisacáridos en *E. coli*, así como su capacidad para generar migración celular y angiogénesis, mostrando resultados positivos.
[...].

Por otra parte, el examinador erróneamente establece que:

El documento D1 menciona la composición del péptido maduro, el cual puede contener L-aminoácidos o D-aminoácidos (Diap. 13), ensayos de actividad antimicrobiana en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, los cuales involucran de manera implícita el contacto entre el péptido antimicrobiano y una superficie que contiene el microorganismo (Diap.17 y 18), ensayos de actividad hemolítica (Diap. 19) y ensayos de actividad citotóxica (Diap. 21).

Los resultados que se evidencian en el documento D1 son del péptido oxysterlina 1 nativa con L-aminoácidos exclusivamente, sin ninguna modificación y los ensayos de actividad antimicrobiana no están relacionados con el contacto entre el péptido y una superficie que contiene el microorganismo.

No puede verse, tal y como lo manifiesta el examinador, que el nivel inventivo verse sobre el método de evaluación de la actividad antimicrobiana, hemolítica y citotóxica.

Así mismo, el examinador manifiesta que respecto a las reivindicaciones dependientes 2 a 6 no se cumple con el requisito de nivel Inventivo:

Las reivindicaciones dependientes 2 a 6 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al péptido antimicrobiano de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no tienen nivel inventivo.

De conformidad con lo establecido por el examinador se ajustó el capítulo reivindicatorio eliminando las reivindicaciones 3 y 6 con la finalidad de determinar puntualmente la materia patentable protegida.

Con respecto a las objeciones de nivel inventivo expuestas por el señor Examinador frente a las reivindicaciones dependientes que no fueron eliminadas y de conformidad con las diferencias establecidas con el documento D1, nos permitimos señalar que habiendo demostrado el nivel inventivo de la reivindicación 1, estas reivindicaciones dependientes cumplen con el requisito estipulado en el artículo 18 de la Decisión 486.

CONCLUSIONES

De conformidad con las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente, y teniendo en cuenta los argumentos aquí presentados para demostrar el nivel inventivo de las reivindicaciones, las objeciones expuestas por el Examinador han sido superadas y por tanto, la solicitud puede ser concedida a título de patente de invención.

Anexo al presente oficio:

- Copia de la solicitud de patente con los ajustes descritos en los capítulos de descripción y reivindicatorio.

Atentamente,

JHON CARLOS CASTAÑO OSORIO

GERMÁN ALBERTO TÉLLEZ RAMÍREZ

LILY JOHANA TORO SEGOVIA

Inventores

**PÈPTIDOS ANTIMICROBIANOS MODIFICADOS DE OXYSTERLINAS DEL
ESCARABAJO COPRÓFAGO OXYSTERNON CONSPICILLATUM**

La presente invención fue realizada en el marco del uso de recursos genéticos y productos derivados colectados en el corregimiento de Pueblo Tapao, departamento del Quindío - Colombia, con contrato de acceso a recursos genéticos en trámite, Auto 147 del 11 de Mayo del 2017 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia, acogiénose al art. 252 de la ley 1753 de 2015. Como constancia de depósito de esta colecta se tiene un registro de los individuos colectados en la colección de Insectos de la Universidad del Quindío con ID del registro biológico número CIUQ12738 y además está el reporte ante el sistema información sobre biodiversidad de Colombia (SIB) con número de certificado 15C3FEF2A51.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención hace parte del campo del diseño de péptidos antimicrobianos que carecen de la toxicidad propia de las secuencias silvestres y pueden ser utilizados como antibióticos y desinfectantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Existe una necesidad urgente para desarrollar o encontrar nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. La antibiótico-resistencia o pérdida de la capacidad de un antibiótico de controlar el crecimiento bacteriano, es un fenómeno mundial, que varía su comportamiento en el tiempo y el espacio. En el mundo, la resistencia a los antibióticos ha aumentado en los últimos años, especialmente por la emergencia y diseminación de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos con resistencia a antibióticos carbapenémicos. Éste es un serio problema que se ha ido incrementando principalmente por el uso indiscriminado de antibióticos para el control de infecciones y por la disminución o poco desarrollo en investigación de nuevas alternativas terapéuticas. Esta es la razón por la cual la búsqueda de nuevos y potentes agentes antimicrobianos se ha convertido en una necesidad urgente para la salud pública mundial.

Una restricción en el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos han sido las dificultades en la búsqueda de nuevas estructuras con propiedades de baja toxicidad para el huésped y un amplio espectro de acción contra bacterias. Una alternativa viable la constituye una familia de compuestos de tipo protéico

denominados péptidos antimicrobianos ó péptidos de defensa del hospedero. Estos agentes hacen parte de la respuesta inmune innata de hospederos vertebrados e invertebrados y son potencialmente terapéuticos convirtiéndose en candidatos ideales para combatir patógenos de tipo bacterias, hongos, virus y protozoos [1] e incluso han mostrado capacidad para controlar el desarrollo de células tumorales [2].

Una batería de péptidos antimicrobianos de amplio espectro son sintetizados de forma rápida y transitoria por el cuerpo graso en insectos [3], [4], [5]. Los genes que los codifican se sabe que se activan principalmente en el cuerpo graso y los hemocitos en diferentes insectos tras la infección bacteriana [6], por ello, los insectos se han convertido en un importante grupo de estudio de estas moléculas efectoras. Las cecropinas, por su parte son una familia de péptidos anfipáticos lineales de 3-4 kDa descritos en la hemolinfa de insectos a principios de los años ochenta [7] [8] [9]; éstas moléculas están desprovistas de residuos de cisteína y contienen generalmente dos segmentos: un dominio N-terminal fuertemente básico y una larga hélice hidrofóbica en el extremo C-terminal, unidos por una bisagra corta [10].

Las cecropinas fueron de los primeros péptidos antimicrobianos identificados. Inicialmente aislados de la polilla de la seda *Hyalophora cecropia*. Análogos de las cecropinas han sido aislados de una variedad de especies de insectos y mamíferos. La familia de las cecropinas contiene de 31 a 39 aminoácidos con un dominio N-terminal anfipático y un dominio hidrofóbico C-terminal. Numerosos análogos sintéticos de las cecropinas naturales han sido usados para elucidar la relación secuencia-actividad. La sustitución de los residuos prolina en el dominio N-terminal disminuye significativamente la actividad, indicando la importancia de la alfa hélice anfipática.

Las cecropinas poseen una amplia actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas. Curiosamente son relativamente inactivas contra *Staphylococcus aureus*. Estas moléculas muestran una buena actividad contra protozoos como *Leishmania*, levaduras como *Candida albicans* y parásitos como *Plasmodium falciparum*; también han mostrado una buena actividad *in-vitro* contra líneas celulares tumorales. Estos péptidos muestran una baja toxicidad contra células eucarióticas y una actividad hemolítica relativamente débil.

El documento de patente CO13-140269 describe un péptido antimicrobiano de la familia de las cecropinas diseñado a partir de la secuencia de la cecropina de la mosca *Lucilia sericata*, con mejora de su carga y momento hidrofóbico, lo que le otorga actividad antimicrobiana mejorada, especialmente contra bacterias Gram-negativas. Se describe la secuencia de aminoácidos que componen el péptido antimicrobiano, así como su actividad frente a diferentes micro-organismos.

Dentro del Orden Coleoptera, se han aislado siete péptidos antimicrobianos en cinco especies, *Zophobas atratus* [12] [13], *Tenebrio molitor* [14] [15] [16] (Cucujoidea), *Holotrichia diomphalia* [17], *Dichotomus dichotoma* [18]. (Scarabaeoidea) y *Tribolium castaneum* (escarabajo de la harina) [19]. Otros estudios han identificado péptidos antimicrobianos de escarabajos, los cuales han sido caracterizados en diferentes familias de compuestos: Defensinas, Coleopterinas, Cecropinas y péptidos antifúngicos [20] [21]. Particularmente, el escarabajo enterrador o necróforo *Nicrophorus vespilloides* tiene un péptido similar a cecropina con una longitud de 10 aminoácidos, reportado en NCBI con el acceso N° XP_017770017.

Además de la actividad antimicrobiana, varias cecropinas mostraron actividad antiinflamatoria fuerte en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), realizando la interacción con LPS sobre la base de sus estructuras alfa-helicoidales [22] [23].

Sólo unos pocos péptidos antibacterianos han sido identificados a partir de un número limitado de especies de estiércol, que incluye un péptido de la larva de *Copris tripartitus* divulgado en el documento KR100790807, así como el péptido: CopA3 de esta misma especie [24], aunque estos documentos no enseñan el método de producción de estos péptidos en células recombinantes. De particular interés, es *Oxysternon conspicillatum* un escarabajo de estiércol; en su ciclo de vida las larvas se alimentan de los hongos, materia orgánica en descomposición, estiércol y otros materiales orgánicos encontrados en las pelotas de estiércol. Por lo tanto, es probable que *O. conspicillatum* se defiende contra la invasión de patógenos por medio de compuestos antimicrobianos.

El documento EP0966481 por su parte, enseña la co-administración de péptidos catiónicos con un agente antibiótico y también proporciona análogos de indolicidina específicos. El análogo de péptido catiónico tiene uno o más aminoácidos alterados al correspondiente ácido D-amino, y en ciertas realizaciones preferidas, el N-terminal y/o el aminoácido C-terminal es un D-aminoácido, así como otro tipo de

modificaciones de los enlaces peptídicos. Contempla de manera general usar como método de producción de los péptidos catiónicos un vector de expresión que comprende un promotor en unión operativa con la molécula de ácido nucleico que expresa el gen del péptido catiónico; y una célula huésped transfectada o transformada con el vector de expresión.

Una de las limitantes del potencial farmacéutico de los péptidos antimicrobianos es su actividad citotóxica y hemolítica en su forma silvestre, por lo que es necesario diseñar péptidos antimicrobianos con bajos o nulos efectos sobre las células de mamíferos, pero que conserven su actividad sobre microorganismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención resuelve este problema al proveer un péptido antimicrobiano modificado, que presenta baja citotoxicidad en células eucarióticas, y especialmente en células de mamífero.

En una modalidad, la presente invención provee un péptido antimicrobiano modificado representado por la Fórmula I:



Este motivo funcional de fórmula I incrementa el efecto antimicrobiano, produce una disminución significativa en la actividad tóxica y hemolítica del péptido modificado.

En otra modalidad de la invención, se proporcionan composiciones que contienen al menos un péptido antimicrobiano modificado. En una modalidad más preferida estas composiciones son de tipo farmacéutico, en otra modalidad estas composiciones son de tipo bactericida.

Así mismo, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos microbianos, incluidas enfermedades por agentes bacterianos y/o parasitarios.

La invención también proporciona usos de los péptidos antimicrobianos o sus composiciones en el tratamiento de infecciones o en esterilización de superficies.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Curva de prueba de tiempo de muerte de las Oxysterlinas 1, 2 y 3 contra *E.coli*. A) Oxysterlina 1 contra *E.coli* ATCC 35218, 1x CMI= 6,25µg/mL; B) Oxysterlina 2 contra *E.coli* ATCC 25922, 1x CMI= 6,25µg/mL; Oxysterlina 3 contra *E.coli* ATCC 25922, 1x CMI= 3,12µg/mL

Figura 2. Actividad citotóxica de las oxysterlinas en células Vero, C1: oxysterlina 1, C2: oxysterlina 2, C3: oxysterlina 3.

Figura 3. Actividad hemolítica contra eritrocitos humanos de los péptidos oxysterlinas, A) oxysterlina 1, B) oxysterlina 2, C) oxysterlina 3.

Figura 4. Neutralización de LPS (lipopolisacarido) por parte de las Oxysterlinas, observando la producción de TNF alfa por parte de PBMCs estimulador con esta endotoxina de *E. coli*. **A)** Neutralización de Oxysterlina 1 (OX1); **B)** Neutralización de Oxysterlina 2 (OX2); **C)** Neutralización de Oxysterlina 3 (OX3).

Figura 5. Actividad de migración celular. Se graficaron los cuatro datos (dos ensayos independientes por duplicado), tomando los datos como no parámetros y se graficó la mediana y el rango intercuartilico. Con tiempos de 18, 24, 30 y 48 horas post-estimulo con la Oxysterlina correspondiente.

Figura 6. Actividad angiogénica de las Oxysterlinas 1 y 3, mediante la formación de tubos capilares por células Endoteliales *in-vitro*. **A)** Número de tubos formados por las células endoteliales (EAhy926) con concentración de 6,25 y 0,625 µg/mL de la Oxysterlina 1; **B)** Número de tubos formados por las células endoteliales (EAhy926) con concentración de 3,12 y 0,312 µg/mL de la Oxysterlina 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona péptidos antimicrobianos modificados denominados Oxysterlinas, cuya forma nativa es secretada/excretada por el
5 escarabajo coprófago *Oxysternon conspiciatum* el cual se encuentra distribuido en Quindío, Colombia. Estos compuestos modificados son útiles para inhibir la infección o crecimiento de microbios patógenos, incluso con resistencia a antibióticos. Además, tales péptidos antimicrobianos modificados tienen actividad inmunomoduladora, neutralizando polisacáridos de la membrana celular bacterial.

10 Las oxysterlinas, tienen una secuencia consenso amino terminal (GSKRWRKFEK (K / R) VK). Un alto punto isoelectrico y relación hidrofóbica que varía de 35 a 41% y una estructura con hélice alfa. Además, coinciden en tener un extremo amino-terminal anfipático y un extremo C-terminal hidrofóbico.

15 Las Oxysterlinas aquí divulgadas, tienen un motivo funcional con la estructura de la fórmula 1:

GSKRWRKFEKX₁₁VKX₁₄KX₁₆X₁₇EX₁₉TKEALPVX₂₇X₂₈X₂₉VX₃₁X₃₂VX₃₄X₃₅X₃₆VGRX₄₀

20 donde:

- X₁₁ es seleccionado entre R, K, Q, N
- X₁₄ está ausente, o es KALEDAKEKLQEERVQ
- X₁₆ es seleccionado entre I, V, L, M, F, A
- X₁₇ es seleccionado entre F, V, L, I, A
- 25 X₁₉ es seleccionado entre E, H
- X₂₇ es seleccionado entre V, I, L, M, F, A
- X₂₈ es seleccionado entre Q, K, N
- X₂₉ es seleccionado entre G, A,
- X₃₁ es seleccionado entre V, A, L, I
- 30 X₃₂ es seleccionado entre A, T
- X₃₄ es seleccionado entre A, V, L, I

X₃₅ es seleccionado entre T, G,
X₃₆ es seleccionado entre A, V, L, I
X₄₀ está ausente, o es R

5

Las modificaciones realizadas respecto al péptido silvestre, se refieren a modificaciones en algunos de los aminoácidos de la secuencia, tal como se observa de los sustituyentes de la fórmula I. o mezclas de éstos y modificaciones como fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, ciclación, modificación de grupos
10 funcionales, introducción de aminoácidos no naturales, unión a moléculas radioactivas, fluorescentes, complejos metálicos, nano partículas, o mezclas de éstos.

Así mismo, la invención contempla realizar modificaciones en este motivo funcional
15 usando D-aminoácidos, en uno o más de sus residuos, siempre que no se altere su estructura α -hélice, por lo que por lo general esta forma de aminoácido se coloca no secuencial o consecutiva dentro del péptido. O las modificaciones generan propiedades del péptido modificado en rangos de hidrofobicidad neta entre 30 – 50%, punto isoelectrico entre 8 – 11, ángulos de hidrofobicidad entre 80-160°.

20

Este motivo funcional, tiene además tres formas preferidas aquí denominadas Oxysterlina 1 (SEQ N° 1), Oxyesterlina 2 (SEQ N°2) y Oxyesterlina 3 (SEQ N° 3).

Igualmente, las secuencias nucleótidas de los péptidos divulgados son parte del
25 alcance de la presente invención, estas secuencias serán evidentes para el técnico medio a partir de las secuencias aquí divulgadas y su simple transformación usando el código genético.

Las oxysterlinas aquí divulgadas presentan actividad citotóxica contra bacterias,
30 incluso en cepas clasificadas como resistentes a antibióticos convencionales. Sin embargo, estas oxysterlinas tienen una reducida citotoxicidad y actividad hemolítica

en células de mamífero, lo que las hace ideales como antimicrobianos de uso en humanos.

5 Otra actividad descrita para las oxysterlinas aquí reveladas es la neutralización de lipopolisacáridos presentes usualmente en bacterias, lo que les permite tener una efectiva detección y control de éstas.

10 Así mismo, las oxysterlinas reveladas estimulan la cicatrización de heridas, entre otras estimulando la migración de queratinocitos e incrementando la actividad angiogénica hacia el punto de incisión.

Composiciones de péptidos antimicrobianos

15 La presente invención incluye composiciones que contienen uno o más péptidos antimicrobianos. En una modalidad preferida estas composiciones son de tipo farmacéutico, en otra modalidad de la invención estas composiciones son de tipo bactericida y/o bacteriostático.

20 Las composiciones de la invención contienen al menos uno de los péptidos aquí divulgados, así como adyuvantes, vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptados. Una composición preferida es la que contiene un péptido oxysterlina en concentración de 0.2 a 100 µg/mL.

25 Las composiciones pueden estar en una forma de dosificación farmacéutica sólida, líquida, gel y combinaciones de las mismas.

30 Además, en una modalidad preferida de la invención pueden comprender adicionalmente un antibiótico. El antibiótico puede ser cualquiera de las opciones farmacéuticas disponibles, preferiblemente seleccionadas de aminoglucósido, penicilina, cefalosporina, fluoroquinolona, tetraciclina y macrólidos.

Así mismo, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos microbianos, incluidas enfermedades por agentes bacterianos y/o parasitarios, mediante la administración por vía parenteral y/o tópica a un sujeto de compuestos terapéuticos, por ejemplo, composiciones y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos antimicrobianos de la invención.

La invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento de bacterias, incluyendo poner en contacto las bacterias con una cantidad eficaz inhibidora, bacteriostática o bactericida de al menos un péptido de la invención, o en combinación con al menos un antibiótico. Las clases de antibióticos que pueden utilizarse en la terapia sinérgica con los péptidos de la invención incluyen, pero no se limitan a aminoglucósido, penicilina, cefalosporina, fluoroquinolona, tetraciclina y macrólidos.

La invención proporciona estrategias de aplicación para usar los péptidos con sus diversas actividades biológicas como inmunomoduladoras, inductores de la migración celular, anti endotoxina, angiogenicos y antitumorales.

Usos de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos fueron ensayados en su capacidad para neutralizar lipopolisacáridos en *E. coli*, así como su capacidad para generar migración celular y angiogénesis, mostrando resultados positivos.

También se realizaron ensayos que muestran su capacidad para estimular la cicatrización o regeneración celular en la epidermis.

Además, al menos una de las oxysterlinas aquí divulgadas tienen actividad antimicrobiana contra *E.coli*, incluso en cepas que presentan resistencia a fármacos; *E. cloacae*, *Salmonella typhi*, *K. pneumonie*, *P. aeruginosa* y *S. saprofítico*.

La Oxysterlina 3 mostró un amplio espectro de acción antimicrobiano sobre microorganismos patógenos y ausencia de actividad hemolítica, señalándolo como un candidato para desarrollar nuevos agentes terapéuticos a utilizarse en primera instancia en heridas que no cicatrizan como las úlceras de pie diabético y las úlceras varicosas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Actividad antimicrobiana de los péptidos

El péptido Oxysterlina 1 se ensayó en cuanto a la actividad antimicrobiana contra *E. Coli* ATCC35218. El péptido tenía una CMI de 1,42 µM (6,25 µg/mL). La Oxysterlina 1 mostró actividad contra las bacterias resistentes a múltiples fármacos, a saber, *E. coli* ESBL, *E. cloacae*, y *Salmonella typhi*; Con CIM de 1,42 - 2,84 µM (6,25 a 12,5 µg/mL) (Tabla 1).

Se analizó la actividad antimicrobiana del Oxysterlina 2 contra algunos Gram positivos, Gram negativos y hongos. Se encuentra que Oxysterlina 2 es activo con una CMI de 7,9 µM (50 µg/mL) contra *E. coli* ATCC 25922 y 3,9 µM (25 µg/mL) contra *K. pneumonie* ATCC BAA1705 UPC (+). Pero no tenía actividad contra *P. aeruginosa* ATCC 105663, *S. saprofiticus* (aislado clínico), *S. aureus* (aislado clínico) y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (Tabla 1).

Oxysterlina 3 tenía actividad antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC 25922 con una MIC de 0,7 µM (3,12 µg/mL), *K. pneumonie* ATCC BAA 1705 UPC (+) con CMI de 0,7 µM (3,13 µg/mL), *P. aeruginosa* ATCC 105663 con CMI de 2,8 µM (12,5 µg/mL) y *S. saprofitico* (aislado clínico) CMI de 2,8 µM (12,5 µg/mL). Esta cecropina no era activa contra *S. aureus* y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cecropinas oxysterlinas 1, 2 y 3.

CMI	Oxysterlina 1	Oxysterlina 2	Oxysterlina 3
Microorganismo	µM	µM	µM
<i>E.coli</i> ATCC25922	5.6	7.9	0.7
<i>E.coli</i> ESBL	1.42	7.9	0.7
<i>Salmonella typhi</i> –aislado clínico	1.42	NA	1.39
<i>Enterobacter cloacae</i> - aislado clínico	2.84	NA	0.7
<i>Staphylococcus epidermidis</i> –aislado clínico	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> - aislado clínico	NA	NA	NA
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	11.2	NA	NA
<i>K.pneumonie</i> ATCC BAA 1705 UPC (+)	NA	3.9	0.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 105663	5.6	NA	2.8
<i>Staphylococcus saprofiticus</i> – aislado clínico	11.2	NA	2.8

NA: actividad no detectada

5 **Ejemplo 2. Prueba de tiempo de muerte de microorganismos patógenos con oxysterlinas.**

Las Oxysterlinas 1, 2 y 3 tenían una actividad dependiente de la concentración contra *E. coli* ATCC35218 o 25922.

10

Oxysterlina1 reduce el crecimiento por debajo del 20% a 5,6 µM (1 MIC), durante los primeros 20 minutos de incubación hasta los 120 minutos (Figura 1A). Concentraciones inferiores a 1,42 µM no inhibieron el crecimiento bacteriano mientras que las concentraciones por encima (2, 4 MIC) redujeron el crecimiento bacteriano completamente durante los 180 minutos del ensayo.

15

Oxysterlina 2 mostró actividad antimicrobiana a 7,9 µM (1 MIC) con un comportamiento similar a Oxysterlina 1 (Figura 1B).

Oxysterlina 3 reduce parcialmente el crecimiento bacteriano a 0,7 μ M (1 MIC) con un comportamiento bacteriostático a esta concentración, pero en concentraciones más altas tiene una actividad bactericida con (2 y 4.6 MICs) (Figura 1C).

- 5 Todas las oxysterlinas mostraron actividad bactericida en curvas de tiempo contra E. Coli ATCC 25922, a 2 MIC (Figura 4), estos resultados indican que esta clase de péptidos tiene un efecto microbicida rápido sobre la E. Coli ATCC 25922 a los 20 minutos.

10 **Ejemplo 3. Actividad citotóxica y hemolítica de oxysterlinas**

- La actividad citotóxica de las oxysterlinas 1 y 3 en células Vero después de 24 h de incubación mostró una viabilidad celular superior al 80% en general con una ligera disminución a 500 μ g/ml para ambas, mientras que la oxysterlina 2 no mostró actividad citotóxica en células Vero (Figura 2). El índice terapéutico (TI) para los oxysterlina 1 es 1,25; oxysterlina 2 es 10; y oxysterlina 3 es 40,13.

- Por otra parte, la Oxysterlina 1 mostró actividad hemolítica contra eritrocitos humanos de 1000 a 125 μ g/ml con 17% a 13% de hemólisis, respectivamente. Oxysterlina 2 mostró actividad hemolítica en concentración de 1000 μ g/ml con 20% de hemólisis mientras Oxysterlina 3 no mostró actividad contra eritrocitos humanos (Figura 3).

25 **Ejemplo 4. Evaluación de la capacidad de neutralizar Lipopolisacarido (LPS) de E. coli in-vitro de las Oxysterlinas 1, 2 y 3.**

- La habilidad de los péptidos para neutralizar o inhibir LPS fue evaluado a través de la habilidad de los mismos de inhibir la producción de TNF alfa en PBMCs estimulados con LPS. EL cultivo de PBMCs es sembrado con 250.000 células por cada pozo en platos de cultivo celular (Cellstar, greiner bio-one, cat-N°655180), los

tratamientos fueron incubados por triplicado por 30 minutos con 10ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654), con la Oxysterlina 1, 2 y 3 a concentraciones de 6,25 y 3,125 µg/mL, medio de cultivo como control de producción basal de TNF alfa y LPS a 10 ng/mL como control de producción de TNF alfa. Las células fueron incubadas por 24 horas para la estabilizar el cultivo celular, posterior a los cuales fueron adicionados los tratamientos y fueron incubadas por 12 horas a 37°C, 5% de CO₂; los sobrenadantes fueron colectados y remplazados con medio de cultivo con 44µM de resazurin para evaluar la viabilidad celular. Los sobrenadantes colectados fueron evaluados por la producción de TNFalfa por un ELISA (Human TNF-α ELISA MAX, BioLegend) siguiendo las instrucciones de manufactura¹.

Brevemente, el Anticuerpo de captura será sembrado en el plato de 96 pozos e incubado toda la noche (18 horas) a 8°C. El plato será lavado 4 veces con 300uL de buffer de lavado. Para bloquear uniones inespecíficas, se adicionarán 200µL de diluyente A 1X por pozo. El plato será incubado 1 hora a temperatura ambiente y lavado cuatro veces nuevamente, luego serán adicionados los estándares y muestras e incubados 2 horas en agitación, el plato será lavado cuatro veces y se adicionarán 100µL de anticuerpo de detección y se incubo por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, el plato fue lavado 4 veces y se adicionó 100µL de solución Avidina-HRP e incubar 30 min a temperatura ambiente, este fue lavado cinco veces y se adicionarán 100µL del sustrato TMB fresco e incubado en oscuridad por 15 minutos, la reacción será parada adicionando 100µL de solución de parada (ácido sulfúrico al 5%) y el plato fue leído a 450 y 570 nm.

Las Oxysterlinas 2, 3 y 4 a 6,25 µg/mL y 3,125 µg/mL disminuyeron la producción de TNF alfa en pg/mL de los PBMCs con respecto al control de células con LPS, por lo tanto, estas Oxysterlinas presentaron una actividad anti-endotoxina con Lipopolisacarido de *E. coli in-vitro* después de 12 horas de incubación. Sin embargo, la Oxysterlina 1 a 6,25 µg/mL y 3,125 µg/mL indujo mayor producción de TNF alfa que el control del LPS, por lo tanto se podría deducir una actividad

inmunomoduladora a nivel de sinergia con el LPS para una posible actividad inflamatoria, ya que por sí sola no se observó inducción en la producción de TNFalfa (Figura 4).

5 **Ejemplo 5. Capacidad de las Oxysterlinas 1, 2 y 3 de inducir migración celular sobre queratinocitos humanos (Línea celular EAhy926).**

El ensayo de ruptura *in-vitro*, es un ensayo de bajo costo y método bien desarrollado para medir migración celular *in-vitro*. Los pasos básicos involucrados para crear una
10 incisión superficial en una monocapa celular, capturando las imágenes en el comienzo y en los intervalos regulares durante la migración celular para cerrar la incisión superficial, y comparar las imágenes para cuantificar la tasa migración de las células. Este ensayo de incisión superficial *in-vitro* está particularmente adecuado para estudios en los efectos de matriz celular e interacciones célula –
15 célula en migración celular, imitando la migración celular durante la cicatrización de una herida *in-vivo* y es compatible la captura de imágenes de células vivas durante migración para monitorear eventos intracelulares, si es deseado. Además, del monitoreo de migración de poblaciones homogéneas de células, este método también ha sido adaptado para medir la migración de células individuales en el
20 borde delantero de la incisión superficial. Sin tomar en cuenta el tiempo de transfección de las células, el ensayo de incisión superficial *in-vitro per se* usualmente toma desde varias horas hasta toda la noche².

Para el ensayo de incisión superficial *in vitro* en presencia de las Oxysterlinas 1, 2
25 y 3 sintéticas, las células de queratinocitos humanos (HaCaT, ATCC® PCS-200-011™) fueron sembradas en condiciones de hiperglicemia (4,5 g/L D-Glucosa) en cajas de cultivo de 25 y 75cm² (Corning, NY, USA) usando DMEM 1 X (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) con L-glutamina y piruvato de sodio, enriquecido con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Corning cellgro, Manassas, VA, USA) y
30 100 µg/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina (100X, Corning cellgro, Manassas, VA, USA) a 37°C y 5% de CO₂ hasta una confluencia de 80-85%. Luego

estas células fueron sub-cultivadas a $2,5 \times 10^5$ células/mL en platos de 24 pozos (Thermo scientific, Dinamarca) a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas hasta una confluencia de 95-98%. A cada pozo se le realizó una ruptura de la monocapa con una punta de 200 µL, lavado tres veces con buffer fosfato salino y tratado con mitomicina C a 3,5 µg/mL (Sigma, Aldrich, M0503) durante 2 horas para inhibir la proliferación celular, cada pozo fue lavado tres veces con buffer fosfato salino, y recubierto con fibronectina (5 µg/mL) por una hora a 37°C. Las márgenes fueron fotografiadas inmediatamente después de realizada la ruptura de la monocapa (0 horas) tres veces por pozo. Luego, las células fueron tratadas con concentraciones de 2,47 µg/mL de la Oxysterlina 1; 50 µg/mL de la Oxysterlina 2; 3,12 y 0,312 µg/mL de la Oxysterlina 3, por un total de 48 horas a 37°C y 5% de CO₂ en 2% de Suero Fetal Bovino (SFB), EGF (20ng/mL) como control de inducción de migración celular, medio de cultivo como control negativo de no inducción de migración, agua destilada estéril como control de vehículo. El área de migración celular fue observada bajo el microscopio invertido (Zeiss Axiovert 200M) y las mismas márgenes fueron fotografiadas a las 18, 24 y 48 horas.

Fueron capturadas tres imágenes por pozo y fueron tomadas las 10 longitudes de la anchura del área de cierre, utilizando el software axiovisión (Leica Application Suite, Software de imágenes versión 4.4.0). Luego se calculó el promedio de las 10 longitudes por pozo, después se calculó el porcentaje de cierre de la herida donde, el tiempo 0 es 100% de herida abierta, siguiendo la siguiente fórmula: porcentaje de cierre de herida = $100 - (PTX * 100 / PTt0)$.

Donde:

PTX: Ancho promedio de herida por pozo por cada tiempo.

PTt0: Ancho promedio de la herida en el tiempo 0.

Medido como el porcentaje de cierre de heridas en queratinocitos humanos (2 y 3 ensayos independientes), los resultados muestran que las Oxysterlinas 1, 2, y 3 inducen migración celular en la Línea Celular HaCaT a las diferentes concentraciones y tiempos evaluados (Figura 5).

Ejemplo 6. Angiogénesis de la Oxysterlina 1 y 3.

Por medio de esta metodología se observó la formación *In vitro* de tubos capilares por células endoteliales (EAhy926) en la matriz de una membrana basal, es un método *in vitro* poderoso para evaluar varios factores que promueven o inhiben angiogénesis. Es para definir las rutas de señalización en angiogénesis, identificando los genes reguladores de angiogénesis y caracterizando las células endoteliales del progenitor.

Para esto se utilizó extracto de membrana basal y se adicionaron 50 µl de extracto en cada pozo, con la finalidad de que el gel se extendiera completamente en el pozo y las células tuvieran una matriz sobre la cual puedan formar los tubos.

Para este ensayo se utilizaron 15000 células por pozo y EBM-2 (Endothelial Basal Medium-2) el cual tuvo (DMEM 1X y SFB 0,5%) como vehiculo, VEGF (40ng/mL) como estimulante en la formación de tubos, FC (factores de crecimiento (50ng/mL) con VEGF (40ng/mL)) para inducir la formación de tubos y tratamientos con las diferentes concentraciones de los péptidos Oxysterlina 1 (6,25ug/mL y 0,625ug/mL) y Oxysterlina 3 (3,12ug/mL y 0,312ug/mL).

La actividad angiogénica de las Oxysterlinas 1 y 3 se pudo observar mediante la formación de mayor número de tubos en comparación con el control de vehículo (EBM-2), incluso se observó mayor número de tubos en los tratamientos con los péptidos que en los controles de crecimiento (FC y VEGF) (Figura 6).

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Péptido antimicrobiano modificado **caracterizado porque** comprende la fórmula I:

GSKRWRKFEKX₁₁VKX₁₄KX₁₆X₁₇EX₁₉TKEALPVX₂₇X₂₈X₂₉VX₃₁X₃₂VX₃₄X₃₅X₃₆V
G RX₄₀ donde:

X₁₁ es seleccionado entre R, K, Q, N

X₁₄ está ausente, o es ALEDAKEKLQEERVQ

X₁₆ es seleccionado entre I, V, L, M, F, A

X₁₇ es seleccionado entre F, V, L, I, A

X₁₉ es seleccionado entre E, H

X₂₇ es seleccionado entre V, I, L, M, F, A

X₂₈ es seleccionado entre Q, K, N

X₂₉ es seleccionado entre G, A

X₃₁ es seleccionado entre V, A, L, I

X₃₂ es seleccionado entre A, T

X₃₄ es seleccionado entre A, V, L, I

X₃₅ es seleccionado entre T, G,

X₃₆ es seleccionado entre A, V, L, I

X₄₀ está ausente, o es R

2. Péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 **caracterizado porque** comprende:

a) Aminoácidos seleccionados del grupo: L-aminoácidos, D- aminoácidos, o mezclas de éstos y modificaciones como fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, ciclación, modificación de grupos funcionales, introducción de aminoácidos no naturales, unión a moléculas radioactivas, fluorescentes, complejos metálicos, nano partículas, o mezclas de éstos.

b) Las modificaciones generan propiedades del péptido modificado en rangos de hidrofobicidad neta entre 30 – 50%, punto isoeléctrico entre 8 – 11, ángulos de hidrofobicidad entre 80-160°.

3. Una composición farmacéutica **caracterizada porque** comprende un péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 y 2 junto excipientes farmacéuticamente aceptables.

5

4. Un método para aplicar el péptido de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado porque** comprende las etapas de:

10 a) Aplicar o integrar el péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 y 2 en un rango de concentración entre 3 – 100 µg/ml; mezclado o integrado sobre una matriz, polímero, gel, película, nano-partículas, compuesta por moléculas orgánicas o inorgánicas.

15 b) Dejar actuar la composición en un espacio, superficie y/o fluido de forma que el péptido antimicrobiano modificado de la reivindicación 1 tenga actividad biológica, antimicrobiana, cicatrizante, inmunomoduladora, neutralización de Lipopolisacárido, angiogénica, quimiotáctica, antitumoral, anti-sepsis.

20 Referencias bibliográficas

1. J. Seema, S. Gopal, S. Diwan, A. Kumar, R. Kumar, S. Maiti, S. Pasha, Interaction studies of novel cell selective antimicrobial peptides with model membranes and *E. coli* ATCC 11775, *Bisht Biochimica et Biophysica Acta*, 1798: 1864-1875 (2010).
- 25 2. Shin SY, Kang JH, Hahm K-S. 1999. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J Pept Res Journal of Peptide Research* 53:82–90
3. Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. 1994. The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today* 10:132–139.
- 30 4. Hoffmann JA. 1995. Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology* 7:4–10.
5. Hoffmann JA, Reichhart J-M, Hetru C. 1996. Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology* 8:8–13.
6. Kaneko Y, Furukawa S, Tanaka H, Yamakawa M. 2007. Expression of Antimicrobial Peptide Genes Encoding Enbocin and Gloverin Isoforms in the Silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71:2233–2241.
- 35 7. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. 2005. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* 106:7–16.
- 40

8. Andreu D, Rivas L. 1998. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers* 47:415–433.
9. Boman HG. 1998. Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review. *Scand J Immunol Scandinavian Journal of Immunology* 48:15–25.
10. Marshall SH, Arenas G. 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron J Biotechnol Electronic Journal of Biotechnology* 6.
11. Yount NY, Yeaman MR. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 52:337-60 (2012 Feb 10).
12. Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Hetru C, Hoffmann JA. 1991. Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.* 266: 24520-5.
13. Bulet P, Cociancich S, Reuland M, Sauber F, Bischoff R, Hegy G, Dorsselaer AV, Hetru C, Hoffmann JA. 1992. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). *Eur J Biochem European Journal of Biochemistry* 209:977–84.
14. Hyun Joo Moon, So Young Lee, Shoichiro Kurata, Shunji Natori, Bok Luel Lee. 1994. Purification and Molecular Cloning of cDNA for an Inducible Antibacterial Protein from Larvae of the Coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J Biochem* 116: 53-8.
15. Lee YJ, Chung TJ, Park CW, Hahn Y, Chung JH, Lee BL, Han DM, Jung YH, Kim S, Lee Y. 1996. Structure and Expression of the Tenecin 3 Gene in *Tenebrio molitor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218:6–11.
16. Chae J-H, Kurokawa K, So Y-I, Hwang HO, Kim M-S, Park J-W, Jo Y-H, Lee YS, Lee BL. 2012. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Developmental & Comparative Immunology* 36:540–46.
17. Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Kurama T, Natori S, Lee BL. 1994. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*. *J Biochem.* Jan;115:82-6.
18. Miyanoshita A, Hara S, Sugiyama M, Asaoka A, Tanai K, Yukuhiro F, Yamakawa M. 1996. Isolation and Characterization of a New Member of the Insect Defensin Family from a Beetle, *Allomyrina dichotoma*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220:526–531.
19. Altincicek B, Vilcinskas A. 2007. Analysis of the immune-inducible transcriptome from microbial stress resistant, rat-tailed maggots of the drone fly *Eristalis tenax*. *BMC Genomics* 8:326.
20. Barbault F, Landon C, Guenneugues M, Meyer J-P, Schott V, Dimarcq J-L, Vovelle F. 2003. Solution Structure of Alo-3: A New Knottin-Type Antifungal Peptide from the Insect *Acrocinus longimanus* ♀. *Biochemistry* 42:14434–14442.
21. Lowenberger C, Bulet P, Charlet M, Hetru C, Hodgeman B, Christensen BM, Hoffmann JA. 1995. Insect immunity: Isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25:867–873.
22. Lee E, Shin A, Kim Y. 2014. Anti-Inflammatory Activities Of Cecropin A And Its Mechanism Of Action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology Arch Insect Biochem Physiol* 88:31–44.

23. Kim J-K, Lee E, Shin S, Jeong K-W, Lee J-Y, Bae S-Y, Kim S-H, Lee J, Kim SR, Lee DG, Hwang J-S, Kim Y. 2011. Structure and Function of Papiliocin with Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities Isolated from the Swallowtail Butterfly, *Papilio xuthus*. *Journal of Biological Chemistry* 286:41296–41311.
- 5 24. Nam HJ, Oh AR, Nam ST, Kang JK, Chang JS, Kim DH, Lee JH, Hwang JS, Shong KE, Park MJ, Seok H, Kim H. 2012. The insect peptide CopA3 inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *Journal of Peptide Science J Pept Sci* 18:650–656.
- 10 25. Jhon Carlos Castano y German Alberto Tellez Ramirez, "Expression and purification of an active cecropin-like recombinant protein against multidrug resistance *Escherichia coli*" *Protein Expression And Purification*, ISSN: 1046-5928 ed: Academic Press, v.100 fasc.N/A p.48 - 53, 2014.
- 15 26. Murugan RN, Jacob B, Ahn M, Hwang E, Sohn H, et al. (2013) *De Novo* Design and Synthesis of Ultra-Short Peptidomimetic Antibiotics Having Dual Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities. *PLoS ONE* 8(11): e80025. doi: 10.1371/journal.pone.0080025.
27. Liang CC¹, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Universidad del Quindío
<120> Péptidos antimicrobianos modificados de Oxysterlina.
<130> Peptido oxysterlina
10 <160> 4
<170> PatentIn version 3.5
15 <210> 1
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial sequence
20 <220>
<223> Artificial antimicrobial peptide
<400> 1
25 Gly Ser Lys Arg Trp Arg Lys Phe Glu Lys Arg Val Lys Lys Ile Phe
1 5 10 15
30 Glu Glu Thr Lys Glu Ala Leu Pro Val Val Gln Gly Val Val Ala Val
20 25 30
35 Ala Thr Ala Val Gly Arg
35
40 <210> 2
<211> 60
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Artificial antimicrobial peptide
45 <400> 2
Gly Ser Lys Arg Trp Arg Lys Phe Glu Lys Lys Val Lys Lys Ala Leu
1 5 10 15
50 Glu Asp Ala Lys Glu Lys Leu Gln Glu Glu Arg Val Gln Lys Ile Val
20 25 30
55 Glu His Thr Lys Glu Ala Leu Pro Val Ile Lys Ala Val Ala Thr Val
35 40 45

Val Gly Val Val Gly Arg Arg
 50 55
 5
 <210> 3
 <211> 44
 <212> PRT
 10 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Artificial antimicrobial peptide
 15 <400> 3
 Gly Ser Lys Arg Trp Arg Lys Phe Glu Lys Arg Val Lys Lys Val Phe
 1 5 10 15
 20 Glu His Thr Lys Glu Ala Leu Pro Val Ile Gln Gly Val Ala Thr Val
 20 25 30
 25 Val Gly Ala Val Gly Arg Arg
 35
 30 <210> 4
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 35 <223> peptide design
 <400> 4
 40 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 45 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 50 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 55 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Gly Ser Lys Arg Trp Arg Lys
85 90 95

5

Phe Glu Lys Arg Val Lys Lys Val Phe Glu His Thr Lys Glu Ala Leu
100 105 110

10

Pro Val Ile Gln Gly Val Ala Thr Val Val Gly Ala Val Gly Arg Arg
115 120 125

15