

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 237**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08867588 .9**  
96 Fecha de presentación: **31.12.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2240511**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2010**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar disfunción eréctil**

30 Prioridad:  
**31.12.2007 CL 38842007**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.11.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA (33.3%)  
FRANCISCO SALAZAR  
01145 TEMUCO, CL;  
UNIVERSIDAD FEDERAL DE SAO PAULO  
(33.3%) y  
LABORATORIOS ANDROMACO S.A. (33.3%)**

72 Inventor/es:  
**ROMERO MEJIA, FERNANDO GONZALO;  
SALVATICI SALAZAR, RAUL PATRICIO y  
MIRANDA, ANTONIO**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 391 237 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para tratar disfunción eréctil

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad sobre la Solicitud n° 3884/2007, presentada el 31 de diciembre de 2007 en el Departamento de la Propiedad Industrial de Chile.

## 10 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a polipéptidos activos desde un punto de vista terapéutico y originalmente obtenidos de la araña chilena *Latrodectus mactans*, así como métodos para su purificación y uso en el tratamiento de la disfunción eréctil (DE).

## 15 ANTECEDENTES

La disfunción eréctil (DE) consiste en la incapacidad para desarrollar y mantener una erección para el acto sexual. El estado puede tener causas psicogenéticas u orgánicas que alteran la respuesta eréctil del paciente. Las variaciones en la intensidad hacen que la disfunción eréctil y su incidencia en la población resulten difíciles de definir. Dependiendo de la definición utilizada, hay diversas estimaciones que oscilan entre los 15 y 30 millones de hombres afectados en el mundo. Según la Encuesta Nacional de Atención Médica Ambulatoria (NAMCS) de 1985, en los Estados Unidos ocho de cada 1.000 hombres que visitaron a su médico hablaron de disfunción eréctil. En 1999 esa cifra prácticamente se había triplicado (hasta unos 22 hombres de cada 1.000), tal vez porque se estaban comenzando a presentar tratamientos y porque el debate sobre la disfunción eréctil empezaba a tener una mayor aceptación. La medicación más publicitada ha sido el tratamiento oral con citrato de sildenafil (Viagra®) (véase, por ejemplo, la Patente estadounidense n° 6.204.383). Los datos de la NAMCS indican que la Viagra® se mencionó unos 2,6 millones de veces durante las visitas médicas en 1999 y un tercio de esas visitas fueron por motivos de diagnósticos no relacionados con la DE.

El proceso de erección exige una secuencia de acontecimientos y la DE puede suceder cuando se interrumpe cualquiera de ellos. Los eventos necesarios incluyen impulsos nerviosos en el cerebro, la médula espinal y la zona que rodea el pene, así como diversas respuestas en los músculos, tejidos fibrosos, venas y arterias del cuerpo cavernoso y cercanas. En ocasiones la disfunción eréctil está asociada con una enfermedad, como la diabetes, renopatía, alcoholismo crónico, esclerosis múltiple, arteriosclerosis, enfermedad vascular o enfermedad neurológica, pero también puede ser un efecto secundario de la medicación (p. ej., un efecto secundario de un antihipertensivo, antihistamínico, antidepresivo, tranquilizante, supresor del apetito o cimetidina). Otras causas incluyen los traumatismos, incluyendo la cirugía (en particular, cirugía prostática) que provoca daños nerviosos o limita el flujo sanguíneo en el pene. En ausencia de cualquier causa orgánica, se puede determinar que la DE tiene un origen psicológico (DEP), como la depresión, la ansiedad, el estrés, la tensión o la culpabilidad. La DE no es una consecuencia normal del envejecimiento, pero su incidencia aumenta con la edad. Alrededor del 5% de los hombres de 40 años y el 25% de los hombres de 65 años padecen DE. El tratamiento con éxito se puede aplicar a cualquier edad.

Los tratamientos farmacológicos estándar para la DE incluyen una clase de fármacos conocidos como inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5), como el citrato de sildenafil (Viagra®). A pesar de que estos fármacos pueden ser muy efectivos, alrededor del 30% del total de los pacientes tratados sufren efectos secundarios. Los inhibidores de PDE5 están asociados con efectos secundarios que incluyen cefalea, enrojecimiento del rostro, molestias estomacales, congestión nasal, infección del tracto urinario, cambios visuales, como cambios leves y temporales en los colores azul/verde o aumento de la sensibilidad a la luz y diarrea. Por otra parte, estos fármacos están contraindicados en pacientes que están tomando fármacos a base de nitratos para la angina de pecho, como nitroglicerina (Nitro-Bid™, entre otros), mononitrato de isosorbida (Imdur™) y dinitrato de isosorbida (Isordil™); anticoagulantes y determinados tipos de bloqueadores alfa para la próstata agrandada (hiperplasia prostática benigna) o tensión arterial elevada. Los inhibidores de PDE5 pueden no ser adecuados para los pacientes que sufren una cardiopatía grave, fallo cardíaco, hipotensión, hipertensión, diabetes incontrolada o que han sufrido un accidente cerebrovascular, así como para los pacientes con trastornos hematológicos que pueden estar asociados con el priapismo (por ejemplo, anemia de células falciformes, mieloma múltiple o leucemia). Por consiguiente, existe una constante necesidad de terapias seguras y efectivas para el tratamiento de la DE.

## 60 RESUMEN

La presente invención presenta composiciones y métodos que se pueden utilizar, entre otras cosas, para el tratamiento de la disfunción eréctil. Las composiciones incluyen un polipéptido aislado del veneno de la araña conocida como la viuda negra, *Latrodectus mactans*, y fragmentos biológicamente activos u otras variantes de los mismos. De este modo, los polipéptidos presentes se pueden obtener de una latrotoxina (p. ej., una latrotoxina alfa) que puede ser, por ejemplo, una proteína precursora de latrotoxina, latrotoxina madura, una proteína asociada a la

latrotoxina o un fragmento biológicamente activo, u otra variante y homólogo de los mismos. La proteína precursora de latrotoxina incluye la secuencia de latrotoxina madura y uno o más de los polipéptidos presentes pueden encontrarse parcial o totalmente dentro de la secuencia de la latrotoxina madura (p. ej., latrotoxina alfa). Los fragmentos biológicamente activos y otras variantes de polipéptidos comprendidos en la invención tendrán secuencias que difieren de una latrotoxina naturalmente presente o de una secuencia de referencia (p. ej., la SEC. ID. N° 1) en determinada medida, pero que conservan la capacidad funcional (p. ej., conservan suficiente actividad para utilizarlos para uno o más de los fines descritos en el presente).

Los polipéptidos, ácidos nucleicos y células huésped descritos en el presente se pueden formular de diversas formas y pueden incluir portadores farmacéuticamente aceptables. Por consiguiente, la invención contiene composiciones fisiológicamente aceptables que están preparadas para la administración, así como concentrados o polvos liofilizados de los polipéptidos presentes. Las formulaciones que están preparadas para la administración y las que exigen una posterior manipulación (por ejemplo, dilución o suspensión) pueden estar empaquetadas como kits con instrucciones de uso y, opcionalmente, cualquier dispositivo o instrumento que pueda facilitar su administración. A pesar de que las secuencias de los polipéptidos presentes pueden variar, los polipéptidos útiles incluyen aquellos que son al menos un 80% idénticos a la SEC. ID. N° 1: GDSLDPAEFACADDIDQAELLNNDICLQCEDLHKEGLVFSLCKTNCFSTEYFQHCVKDLEEAKEPPE (SEC. ID. N° 1). En algunas realizaciones, los polipéptidos presentes excluyen específicamente aquellos que se componen o incluyen la secuencia representada por la SEC. ID. N° 2, que es también conocida como proteína 2 asociada a la alfa-latrotoxina (número Genbank AAY33774; GI:63109347) y tiene la secuencia de aminoácido: MLKLICIAFLVTVLTLVAGQDSLDPAEFGCADDVNQAELLKNNDICLQCEDLHKEGVVFSLCKTNCFTTEYFQHCVKDLEEAKEPPE (SEC. ID. N° 2; la secuencia contigua mostrada aquí en bloques de 10 aminoácidos).

La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos presentes puede diferir de la SEC. ID. N° 1, por el hecho de contener (o solamente contener) una o más deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden considerarse conservadoras, como una sustitución dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histodina y arginina; y fenilalanina y tirosina. También se pueden realizar sustituciones no conservadoras e incorporar aminoácidos no presentes naturalmente. Alternativamente, o adicionalmente, la secuencia de aminoácidos puede diferir de la SEC. ID. N° 1 (que se puede considerar la secuencia "de referencia"), por el hecho de contener una inserción y/o deleción de uno o más residuos de aminoácidos.

Más concretamente, los polipéptidos de la invención pueden incluir o consistir en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. N° 1. También dentro del alcance de la invención se encuentran los polipéptidos que son al menos un 70% idénticos a la SEC. ID. N° 1 (p. ej., al menos un 80, 85, 87, 90, 95, 97, o 98% idénticos). En algunas realizaciones, los polipéptidos presentes excluyen el polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N° 2.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos presentes también se encuentran dentro del alcance de la invención. Los ácidos nucleicos son útiles, por ejemplo, para obtener los polipéptidos de la presente invención y como agentes terapéuticos. Pueden ser administrados en las células en un cultivo o *in vivo* y pueden incluir secuencias reguladoras (p. ej., un promotor, que puede ser específico para el tejido) y secuencias que codifican una señal secretoria que dirige o facilita la secreción de los polipéptidos de una célula. A pesar de que podemos referirnos a los ácidos nucleicos como "aislados", señalamos que los ácidos nucleicos presentes pueden incluir secuencias no presentes naturalmente y, por ese motivo, se distinguirían de los ácidos nucleicos en su entorno natural. Similarmente, a pesar de que podemos referirnos a los polipéptidos como "purificados" (o "sustancialmente puros"), donde los polipéptidos difieren de un polipéptido naturalmente presente, se distinguen de los polipéptidos naturalmente presentes sobre esa base (y, por tanto, cierto grado de pureza no es necesario para la patentabilidad).

Como se ha señalado, los vectores recombinantes (o "construcciones") y las células huésped también se proporcionan. Un vector recombinante puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos actualmente descritos y esas secuencias pueden estar operativamente unidas a una o más regiones reguladoras dentro del vector adecuado para el uso en un sistema de expresión eucariótico o procariótico (muchos de ellos conocidos en el campo). La región reguladora puede ser, por ejemplo, un promotor. Los promotores útiles incluyen promotores específicos para un tipo de célula, los promotores específicos para un tejido, los promotores activos constitutivamente y los promotores de expresión amplia. Las células huésped pueden ser células de bacterias, hongos, insectos, plantas o mamíferos que incluyen estas construcciones de ácido nucleico.

Los polipéptidos se pueden formular como composiciones farmacéuticas en cualquier medio farmacéuticamente aceptable. Se pueden añadir portadores y agentes estabilizantes para facilitar la administración del fármaco y garantizar la vida útil. Las formulaciones se pueden adaptar a la vía de administración y pueden incluir ingredientes adecuados, por ejemplo, para la administración oral, parenteral, pulmonar, tópica o transdérmica o transmucosa. Por ejemplo, la encapsulación de los polipéptidos en un vehículo de administración adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de la administración.

5 Las composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas) pueden incluir un segundo ingrediente farmacéuticamente activo. El segundo ingrediente farmacéuticamente activo puede ser otro agente útil para el tratamiento de la DE (p. ej., un inhibidor de PDE5 (como el citrato de sildenafil)). No obstante, las composiciones de la invención no son tan limitadas y abarcan también otros agentes como prostaglandinas, hormonas (p. ej., testosterona), apomorfina, activadores de la melanocortina y/o yohimbina.

10 Los métodos de la invención incluyen métodos para el tratamiento de un sujeto (p. ej., un paciente humano) con una condición asociada con un músculo liso disfuncional (p. ej., disfunción eréctil). Estos métodos pueden incluir los pasos de: a) identificación de un sujeto que padece o es probable que padezca disfunción eréctil, y b) proporcionar al sujeto una composición que incluya un polipéptido de latrotoxina o variantes biológicamente activas de un polipéptido de latrotoxina (p. ej., un polipéptido sustancialmente puro que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos un 80% idéntica a la SEC. ID. N° 1).

15 Las composiciones se pueden administrar a un sujeto de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o transmucosa, oral, parenteral, intraperitoneal o intrapulmonar. La dosis necesaria dependerá de varios factores normalmente tenidos en cuenta por los médicos. Estos factores incluyen la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la enfermedad subyacente del paciente, si corresponde, el tamaño del sujeto, el peso, la superficie total, la edad, el sexo, otros fármacos administrados al paciente y la opinión del médico responsable. Las dosis adecuadas oscilan entre 0,01-100,0 µg/kg. Las composiciones se pueden administrar junto con o adicionalmente a otros tratamientos para la disfunción eréctil (p. ej., dispositivos médicos, cirugía, psicoterapia).

20 Los polipéptidos de latrotoxina también se pueden utilizar en la preparación de un medicamento; el medicamento se puede utilizar para el tratamiento de la disfunción eréctil. Los polipéptidos susceptibles de este uso incluyen los polipéptidos sustancialmente puros que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEC. ID. N°1. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido no es la SEC. ID. N°2. Otros polipéptidos útiles incluyen aquellos en los que la secuencia de aminoácidos difiere de la SEC. ID. N° 1, por el hecho de contener una o más sustituciones de aminoácidos, que pueden incluir o no sustituciones de aminoácidos conservadoras, y/o una o más inserciones o deleciones de aminoácidos. Los polipéptidos utilizados en la preparación del medicamento pueden comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% idéntica a la SEC. ID. N° 1 (p. ej., 100% idéntica a la SEC. ID. N° 1).

35 Un método para obtener los polipéptidos de latrotoxina también se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el método incluye el cultivo de células huésped durante un tiempo y en condiciones apropiadas para la expresión de cualquiera de los polipéptidos presentes, seguido del aislamiento de los polipéptidos de las células huésped o del medio en el que se cultivaron las células huésped.

40 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se proporcionan en las ilustraciones adjuntas y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención se pondrán de relieve en la descripción y las ilustraciones, así como en las reivindicaciones.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

45 La Figura 1 muestra un gráfico que compara el efecto del citrato de sildenafil sobre la relajación del cuerpo cavernoso, en presencia (■) y ausencia (▲) de F40/7481 (SEC. ID. N° 1) a una concentración de 2 µg/ml.

50 La Figura 2 ilustra los resultados de un ensayo RT-PCR para identificar pares de cebadores útiles para la amplificación del ARNm de  $\alpha$ -latrotoxina de *Lactrodectus mactans*.

La Figura 3 ilustra el perfil cromatográfico de un extracto bruto de 4.500 glándulas venenosas de *L. mactans*.

La Figura 4 ilustra un perfil cromatográfico HPLC de la fracción f40/7841 mostrada en la Figura 3.

55 La Figura 5 ilustra la masa molecular del polipéptido f40/7841.

La Figura 6A muestra la cámara orgánica utilizada para el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso; la Figura 6B muestra un primer plano de una única muestra del cuerpo cavernoso en la cámara orgánica.

60 La Figura 7 ilustra los resultados de un experimento que muestra el efecto del polipéptido F40/7841 sobre el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso.

La Figura 8 ilustra los resultados de un experimento que muestra el efecto del polipéptido f40/7841 sobre el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso en presencia de la fracción purificada f40/7841 a 0,1 µg/ml.

65

La Figura 9 ilustra un rastreo análogo que muestra el efecto de la fenilefrina sobre la contractilidad del cuerpo cavernoso.

5 La Figura 10 ilustra un rastreo análogo que muestra el efecto del polipéptido F40/7841 sobre el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso.

La Figura 11 ilustra rastreos análogos de un experimento que analiza el efecto de f40/7841 sobre el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso, en presencia de L-NAME, un agente que bloquea la producción de ON.

10 La Figura 12 ilustra rastreos análogos de un experimento que analiza el efecto de f40/7841 sobre el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso, en presencia de L-NAME, un agente que bloquea la producción de ON.

La Figura 13 ilustra rastreos análogos de un experimento que analiza el efecto de f40/7841 sobre el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso, en presencia del agonista  $\alpha$ -adrenérgico, atropina.

15 La Figura 14 ilustra rastreos análogos de un experimento que analiza el efecto de f40/7841 sobre el ensayo de relajación del cuerpo cavernoso, en presencia del agonista  $\alpha$ -adrenérgico, atropina.

20 La Figura 15 ilustra los resultados de un experimento de pinzamiento de membrana del conjunto celular que analiza el efecto del agonista del receptor nicotínico alfa 7 de acetilcolina, carbacol, sobre la activación del canal de potasio en las células PC12 modificadas para expresar el receptor nicotínico alfa 7 de acetilcolina.

25 La Figura 16 ilustra los resultados de un experimento de pinzamiento de membrana del conjunto celular que analiza el efecto del polipéptido F40/7841 en presencia del agonista del receptor nicotínico alfa 7 de acetilcolina, carbacol, sobre la activación del canal de potasio en las células PC12 modificadas para expresar el receptor nicotínico alfa 7 de acetilcolina.

30 La Figura 17 muestra una fotografía de células C2C12 que han sido cargadas con el fluorocromo, fluo-3AM (paneles derecho e izquierdo) y un gráfico (panel central) que ilustra el efecto del polipéptido f40/7841, el ionóforo de calcio, 4-Br-A23187, y el quelante del calcio, EGTA sobre el flujo de calcio.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 La presente invención se basa, en parte, en nuestro descubrimiento de un polipéptido aislado de la araña chilena *Latrodectus mactans*. El polipéptido y los fragmentos biológicamente activos y otras variantes de los mismos son útiles en el tratamiento de estados tales como la disfunción eréctil. El polipéptido, designado en los experimentos descritos a continuación como "F40/7481" tiene un peso molecular de unos 7,5 kDa, seis residuos de cisteína, que pueden formar tres uniones de disulfuro internas, y la secuencia de aminoácido: GDSLDPAEFA CADDIDQAE LKNNIDICLQC EDLHKEGLVF SLCKTNCFST EYFQHCVKDL EEAKKEPPE (SEC. ID. N° 1; mostrándose aquí la secuencia contigua en bloques de 10 aminoácidos).

40 El polipéptido y composiciones farmacéuticamente aceptables que lo incluyen tienen un efecto miorelajante sobre el músculo liso, por el ejemplo el cuerpo cavernoso y, por tanto, son útiles para el tratamiento de estados en los cuales la relajación del músculo liso resulta problemática. Por ejemplo, los polipéptidos presentes se pueden utilizar en el tratamiento de la disfunción eréctil. A pesar de que las composiciones presentes no se limitan a aquellas que ejercen su efecto a través de algún mecanismo celular en particular, nuestra hipótesis de trabajo es que, con respecto a la disfunción eréctil, los efectos de los polipéptidos están mediados por el ON a través de una vía colinérgica. Por otra parte, la vía no parece implicar la movilización de calcio.

50 *Polipéptidos:* En el campo se sabe que algunos venenos o toxinas pueden provocar una erección. Por ejemplo, una alfatoxina (MW 7,427 Da) aislada del escorpión *Tytus serrulatus* (Teixeira *et al.*, 2003) parece responsable de la liberación del ON en el cuerpo cavernoso de los conejos e induce la relajación y la erección del pene. Por otra parte, de la araña *Latrodectus mactans tredecirnguttatus* (Grasso A., 1976; Krasnoperov VG. *et al.*, 1990; Kovalevskaia GI. *et al.*, 1990, W09529235), tres fracciones de latrotoxina alfa (a-LTX) de elevado peso molecular, específica de los vertebrados (Knipper M. *et al.*, 1986; véase también Meidolesi J. *et al.*, 1983; Magazanik LG. *et al.*, 1992 (en insectos), Henkel *et al.*, 1999; Ichtchenko/1998, Krasnoperov *et al.*, 1999; Dulubova *et al.*, 1996); insectotoxina alfa-205 (a-LIT), específica de los insectos (Kiyatkin, N. *et al.*, 1993) y latrocrustotoxina alfa-125 (a-LCTX), específica de los crustáceos (Krasnoperov VG. *et al.*, 1990) fueron identificadas, secuenciadas y clonadas. Se han aislado toxinas de actividad específica contra los tejidos de mamíferos a partir de muestras de araña (Rach *et al.* 2002).

60 La secuencia del polipéptido de 69 aminoácidos obtenida por los inventores a partir de la araña chilena *Latrodectus mactans* demostró un grado relativamente elevado de conservación de la secuencia (78.41%) con polipéptidos de otras especies de *Latrodectus*, L. *mactans tredecirnguttatus*. Sin embargo, las diferencias en su estructura sugieren que el polipéptido puede tener propiedades farmacológicas diferentes y nuevas en comparación con las descritas para los polipéptidos en WO 95/29235.

65

Se ha demostrado que los polipéptidos de otras arañas presentan propiedades farmacológicas distintas. Tres polipéptidos con pesos moleculares de 4973, 4993 y 5159 Da se obtuvieron de la araña *Segestria florentina* de Asia Central. El primero tenía un efecto neurobloqueante de la transmisión sináptica sobre la acción de los receptores de glutamato, el segundo inducía la modulación de los terminales presinápticos y postsinápticos, y el tercero actuaba sobre los terminales presinápticos. Dado que estos péptidos causan parálisis en los insectos cazados por la araña, han sido propuestos como potenciales insecticidas.

La citotoxina que bloquea otros canales iónicos de manera general se ha obtenido de otras especies de araña, pero estas toxinas no tienen un efecto sobre la relajación del músculo liso y, por tanto, no tienen propiedades eréctiles. Por ejemplo, Cardoso et al., 2003, aisló fracciones del polipéptido de *Phoneutria nigriventer* que le permitieron identificar y caracterizar la constitución molecular de diferentes familias de canales iónicos y definir sus relaciones evolutivas. Filipov et al., 1994, demostró que la expresión ectópica de receptores de  $\alpha$ -LTX en *Xenopus laevis* oocytes resultaba en la formación de canales iónicos con un flujo superior a 10 pS de  $\text{Ca}^{2+}$ . La N-Atracotoxina (N-ACTXs) es una toxina polipeptídica aislada de una especie de araña australiana, *Hadronyche versuta*, que actúa sobre los canales lentos de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ), de manera similar a las toxinas obtenidas de los escorpiones *Leirus quinquestriatus hebraeus* y *Androctonus euatralis hector* (Szeto et al., 2000). Del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (Mintz et al., 1992; Cestele et al., 2000; Tedford et al., 2004) se aislaron polipéptidos que tenían una actividad de bloqueo del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los terminales presinápticos de las neuronas de los insectos y los terminales dendríticos de la neurona de Purkinje en cerebros de ratas; el polipéptido activo fue designado  $\omega$ -Aga-IVA, de masa molecular 6051 Da. de 48 pares de bases. Otros también han identificado bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T/Q de esta especie de araña, mientras que de la especie *Grammastola spatulata* se han identificado polipéptidos que bloquean los canales  $\text{K}^+$  dependientes del voltaje (Swartz et al., 1995 y Fletcher et al., 1997). En 2004, Suchyna de la Universidad de Buffalo identificó una proteína presente en el veneno de la tarántula chilena *Phyxotrichus Rosea*, que puede bloquear la acción de los canales iónicos, que se abren y se cierran cuando la célula se colapsa o se estrecha. Su acción está asociada con funciones tan diversas como el sentido del tacto, la audición, la tensión arterial y la coordinación y contracción musculares, lo que pone de manifiesto las propiedades terapéuticas de los antiarrítmicos.

La araña chilena, *Latrodectus mactans*, pertenece al género *Latrodectus*. Su veneno contiene una rica combinación de latrotoxinas y otras sustancias biológicamente activas que afectan al sistema nervioso de las víctimas. Cuando reciben una picadura, los humanos experimentan un fuerte dolor abdominal, escalofríos, fiebre, vómitos, taquicardia, hipertensión arterial y priapismo; se han registrado muertes tanto en niños como en adultos. Hasta la fecha se ha averiguado que el veneno contiene siete proteínas con actividad neurotóxica, incluyendo cinco insectotoxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ -LIT), una latrocrustatoxina,  $\alpha$ -LCT (120 kDa), y una toxina de vertebrados,  $\alpha$ -LTX (130 kDa). Por otra parte, se han identificado y clonado dos proteínas de bajo peso molecular (conocidas como PBPM) que normalmente copurifican con  $\alpha$ -LTX. Las PBPM están estructuralmente relacionadas con las hormonas hiperglicémicas de crustáceo y tienen masas moleculares de 8 y 9.5 kDa. Las latrotoxinas ejercen sus efectos tóxicos en parte formando complejos tetraméricos que se insertan en las membranas lipídicas de las células y actúan como poros permeables al calcio, lo que provoca una liberación masiva de neurotransmisores de los terminales nerviosos.

Los términos "polipéptido" y "péptido" se utilizan en el presente para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos de la subunidad, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos, independientemente de la modificación postranslacional (por ej. amidación, fosforilación o glicosilación). Las subunidades se pueden unir mediante enlaces de péptidos u otros enlaces como, por ejemplo, enlaces éster o éter. El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o antinaturales o sintéticos, que pueden ser isómeros ópticos de forma D o L.

Los polipéptidos presentes, fragmentos biológicamente activos, y otras variantes de los mismos pueden ser sintetizados químicamente, purificados a partir de fuentes naturales, o purificados a partir de células en las que el polipéptido o una variante biológicamente activa del mismo se produce de forma recombinante. Los métodos necesarios para la síntesis, expresión y purificación del péptido son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, los péptidos pueden ser químicamente sintetizados utilizando la química convencional f-moc y purificados utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los polipéptidos pueden ser purificados con cualquier método conocido en el campo incluyendo, a título meramente enunciativo, el fraccionamiento, la centrifugación y la cromatografía (p. ej., filtrado de gel, cromatografía de intercambio iónico, HPLC de fase inversa y purificación por inmunoafinidad).

Los polipéptidos presentes pueden ser sustancialmente purificados, aunque no necesariamente. Los polipéptidos presentes serán sustancialmente puros cuando hayan sido separados de los componentes (p. ej., componentes celulares) con los que estaban anteriormente asociados, de forma que una composición en la que estén contenidos sea al menos o alrededor de un 60% (p. ej., al menos o alrededor de un 70%, 80%, 90% 95% o 99%), en peso, el polipéptido de interés. En general, un polipéptido sustancialmente puro dará una única banda principal en un gel de poliacrilamida no reductor.

Para producir un polipéptido f40/7481 recombinante o un fragmento biológicamente activo o una variante del mismo, se puede unir un ácido nucleico que codifica el péptido a un vector de expresión y utilizarse para transformar una

célula huésped procariótica (p. ej., bacteria) o eucariótica (p. ej., insecto, levadura, planta o mamífero). En general, las construcciones de ácido nucleico pueden incluir una secuencia reguladora operativamente unida a un ácido nucleico que codifica el polipéptido f40/7481. Las secuencias reguladoras (p. ej., promotores, potenciadores, señales de poliadenilación o terminadores) no codifican típicamente el producto de un gen, sino que afectan a la expresión de una secuencia de ácido nucleico. Estas células transformadas o transfectadas pueden entonces ser utilizadas, por ejemplo, para la producción a pequeña o gran escala del polipéptido con métodos conocidos en el campo. Básicamente, estos métodos implican el cultivo de células en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido y el aislamiento del polipéptido de las células o del medio de cultivo.

Una construcción puede incluir una secuencia marcadora diseñada para facilitar las posteriores manipulaciones de la secuencia de ácido nucleico expresada (p. ej., purificación o localización). Las secuencias marcadoras, como la proteína fluorescente verde (GFP), glutación S-transferasa (GST), c-myc, hemaglutinina,  $\beta$ -galactosidasa, o las secuencias marcadoras Flag™ (Kodak) se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico. Estos marcadores se pueden insertar en una secuencia de ácido nucleico de forma que estén expresados en cualquier parte a lo largo de un polipéptido codificado incluyendo, por ejemplo, en el término carboxilo o amino. El tipo y la combinación de secuencias marcadoras y reguladoras pueden variar dependiendo de cada huésped, sistema de clonado o expresión y resultado deseado concreto. Hay diversos vectores de expresión y clonado que contienen combinaciones de secuencias reguladoras y marcadoras disponibles en el mercado. Entre los vectores de clonado adecuados se encuentran, a título meramente enunciativo, pUC18, pUC19, y pBR322 y derivados de los mismos ("New England Biolabs, Beverly, MA), y pGEN (Promega, Madison, WI). Por otra parte, los vectores de expresión procariota representativos se incluyen, a título meramente enunciativo, pBAD (Invitrogen, Carlsbad, CA); la familia de vectores pTYB (New England Biolabs), y los vectores pGEMEX (Promega); los vectores de expresión de mamíferos representativos incluyen, a título meramente enunciativo, pTet-On/pTet-Off (Clontech, Palo Alto, CA), pIND, pVAXI, pCR3.1, pcDNA3.K pcDNA4, o pUni (Invitrogen), y pCI o pSI (Promega); los vectores de expresión de insectos representativos incluyen, a título meramente enunciativo, pBacPAK8 o pBacPAK9 (Clontech), y p2Bac (Invitrogen); y los vectores de expresión de levadura representativos incluyen, a título meramente enunciativo, MATCHMAKER (Clontech) y pPICZ A, B, y C (Invitrogen).

En los sistemas bacterianos, la *Escherichia coli* se puede utilizar para expresar fragmentos de un polipéptido f40/7481 o variantes biológicamente activas del mismo. Por ejemplo, el *E.coli* de tipo DH10B (Invitrogen) se puede transformar con el vector de amplio rango de huéspedes Gram negativo pCM66 que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido f40/7481. En otro ejemplo, las células BL-21 se pueden transformar con un vector pGEX que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido f40/7481. La bacteria transformada se puede aumentar exponencialmente para después estimularse con isopropiltiogalactopiranosida (IPTG) antes de recogerla. En general, los polipéptidos de fusión GST producidos a partir de un vector de expresión pGEX se pueden purificar a partir de células lisadas mediante absorción en perlas de glutationa-agarosa, seguido de elución en presencia de glutationa libre. Los vectores pGEX pueden estar diseñados para incluir sitios de clivaje de proteasa de factor Xa o trombina, de forma que el polipéptido expresado (p. ej., el polipéptido f40/7481) puede ser liberado de la fracción GST.

La invención comprende también peptidomiméticos de los polipéptidos presentes o fragmentos de los mismos, que son pequeños polímeros similares a proteínas que contienen elementos estructurales no peptídicos y que son capaces de imitar o antagonizar las acciones biológicas de un péptido matriz natural (aquí, un polipéptido f40/7481). Además de ser compuestos no péptidos sintéticos, los peptidomiméticos tienen una conformación tridimensional (es decir un "motivo de péptido") que es sustancialmente igual que la conformación tridimensional de un péptido seleccionado. El motivo de péptido proporciona al compuesto peptidomimético la capacidad de unirse al receptor de una forma cualitativamente idéntica a la del péptido matriz del que se obtuvo el peptidomimético. Los compuestos peptidomiméticos pueden tener características adicionales que mejoran su utilidad terapéutica, como una mayor vida media biológica.

Los peptidomiméticos tienen típicamente un ramal central que es parcial o completamente no péptido, pero con grupos laterales que son idénticos a los grupos laterales de los residuos de aminoácidos presentes en el péptido en el que se basa el peptidomimético. Varios tipos de enlaces químicos (p. ej., enlaces éster, tioéster, tioamida, retroamida, carbonilo reducido, dimetileno y quetometileno) son conocidos en el campo por ser generalmente sustitutos útiles de los enlaces péptidos en la construcción de peptidomiméticos resistentes a la proteasa y pueden ser empleados en el contexto de los polipéptidos presentes.

Cualquier peptidomimético que tenga una cantidad suficiente de actividad biológica (p. ej., una cantidad de permita que el péptido sea experimental o clínicamente útil como sustituto del polipéptido f40/7481) puede ser utilizado en los métodos presentes.

Las variantes biológicamente activas de los polipéptidos presentes pueden incluir modificaciones estructurales. Por ejemplo, uno puede modificar químicamente el ramal principal del péptido y/o una o más de las cadenas laterales. Las modificaciones químicas pueden ser modificaciones naturales realizadas *in vivo* tras la translación de un ARNm que codifica el polipéptido (p. ej., glicosilación en un huésped bacteriano) o modificaciones sintéticas realizadas *in vitro*. Una variante biológicamente activa de un fragmento de un polipéptido f40/7481 puede incluir una o más

modificaciones estructurales resultantes de cualquier combinación de modificaciones naturales (es decir, realizadas naturalmente *in vivo*) y sintéticas (es decir, modificaciones naturales o no naturales realizadas *in vitro*). Algunos ejemplos de modificaciones incluyen, a título meramente enunciativo, la amidación (p. ej., la sustitución del grupo carboxilo libre del C-terminal por un grupo amino); biotilación (p. ej., acilación de lisina u otros residuos de aminoácidos reactivos con una molécula de biotina); glicosilación (p. ej., adición de un grupo glicosilo a residuos de asparagina, hidroxilisina, serina o treonina para generar una glicoproteína o un glicopéptido); acetilación (p. ej., la adición de un grupo acetilo, típicamente en el N-terminal de un polipéptido); alquilación (p. ej., la adición de un grupo alquilo); isoprenilación (p. ej., la adición de un grupo isoprenoide); lipoilación (p. ej., unión de una fracción de lipato); y fosforilación (p. ej., la adición de un grupo fosfato a serina, tirosina, treonina o histidina).

Los polipéptidos descritos en el presente pueden ser sintetizados químicamente, purificados a partir de fuentes naturales (en la medida en que existan en esas fuentes o se pueden obtener de proteínas naturalmente presentes (por ejemplo, mediante digestión), o purificados a partir de células en las que el polipéptido f40/7481 o una variante biológicamente activa del mismo se produce recombinantemente. Los métodos necesarios para la síntesis, expresión y purificación del péptido son bien conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, Kimmerlin y Seebach (J. Pept. Res. 65:229-260, 2005). Por ejemplo, los péptidos pueden ser sintetizados químicamente, utilizando la química convencional f-moc y purificados empleando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las técnicas refinadas de síntesis química en fase sólida combinadas con la condensación del fragmento y métodos de unión han permitido la síntesis precisa de péptidos de más de 150 aminoácidos de longitud. La síntesis del péptido en fase sólida se compone de tres conjuntos distintos de operaciones: 1) conjunto en cadena en una resina; 2) clivaje simultáneo o secuencial y desprotección de la cadena totalmente protegida del enlace de resina; y 3) purificación y caracterización del péptido diana. Existen diversas estrategias químicas para las operaciones de conjunto en cadena y clivaje/desprotección, pero los métodos de purificación y caracterización son más o menos iguales a los métodos utilizados para generar el producto péptido bruto. Dos químicas principales para la síntesis del péptido en fase sólida son Fmoc (grupo de protección lábil de la base) y t-Boc (grupo de protección  $\alpha$ -amino lábil del ácido). Cada método implica fundamentalmente diferentes métodos de protección y posterior clivaje/desprotección de la cadena lateral de aminoácidos y resinas; el método t-Boc exige el uso de un HF más fuerte que contiene solamente anisol o anisol más otros fagocitos, donde el péptido-resina montado mediante química Fmoc normalmente es clivado por los reactivos menos duros K o R. La química Fmoc es conocida por la síntesis de péptidos de mayor calidad y cantidad que la química t-Boc. Las impurezas de los péptidos sintetizados con t-Boc se atribuyeron en su mayor parte a problemas de clivaje, deshidratación y t-butilación. Para el conjunto del péptido HBTU/HOBt, el acoplamiento mediado por carbodiimida y PyBOP/HOBt son métodos generalmente utilizados. Los péptidos sintéticos son típicamente purificados mediante HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) de fase inversa, utilizando columnas como C-18, C-8 y C-4.

**Ácidos nucleicos:** Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” pueden ser utilizados indistintamente para referirse al ARN o ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, ADN sintético y ADN (o ARN) que contiene análogos del ácido nucleico. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional. Un ácido nucleico puede ser de doble cadena o de cadena única (es decir, una cadena sentido o antisentido) Algunos ejemplos de polinucleótidos incluyen genes, fragmentos de genes, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm) y porciones del mismo, ARN de transferencia, ARN ribosomal, ARN pequeño de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés), micro-ARN, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores, así como análogos de ácido nucleico. En el contexto de la presente invención, los ácidos nucleicos pueden codificar un fragmento de un polipéptido f40/7481.

Un ácido nucleico “aislado” puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN naturalmente presente o un fragmento de la misma, siempre que al menos una de las secuencias de ácido nucleico que normalmente se encuentran inmediatamente al lado de esa molécula de ADN en un genoma naturalmente presente sea eliminada o esté ausente. Así, un ácido nucleico aislado incluye, a título meramente enunciativo, una molécula de ADN que existe como una molécula separada, independiente de otras secuencias (p. ej., un ácido nucleico químicamente sintetizado o un fragmento de ADN genómico o ADNc producido por una reacción de la cadena de polimerasa (PCR) o por tratamiento de endonucleasa de restricción). Un ácido nucleico aislado también se refiere a una molécula de ADN que está incorporada en un vector, un plásmido que se replica autónomamente, un virus, o en el ADN genómico de una procarionota o eucariota. Por otra parte, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado, como una molécula de ADN que forma parte de un ácido nucleico de fusión o híbrido. Un ácido nucleico existente entre muchos (p. ej., docenas o cientos a millones) de otros ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, librerías de cADN o librerías genómicas, o láminas de gel que contienen una digestión de restricción de ADN genómico, no es un ácido nucleico aislado.

Las moléculas de ácido nucleico aislado se pueden producir mediante técnicas estándar. Por ejemplo, las técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) se pueden utilizar para obtener un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia de nucleótidos descrita en el presente, incluyendo secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido descrito en el presente (es decir, un polipéptido F40/7481). La PCR se puede utilizar para amplificar secuencias específicas de ADN y de ARN, incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Diversos métodos de PCR se describen en el presente como, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual,

Dieffenbach y Dveksler, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Por lo general, la información de la secuencia de los extremos de la región de interés o más allá se emplea para diseñar cebadores de oligonucleótidos que son idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas de la plantilla a amplificar. También hay diversas estrategias de PCR disponibles con las que se pueden introducir modificaciones de la secuencia de nucleótidos específica de un sitio en una plantilla de ácido nucleico (cuando se desee, por ejemplo, cuando se haga una variante biológicamente activa de un fragmento de un polipéptido f40/7481).

Los ácidos nucleicos aislados también se pueden sintetizar químicamente, sea como una única molécula de ácido nucleico (p. ej., utilizando la síntesis de ADN automatizada en la dirección 3' a 5' utilizando una tecnología de fosforamidita) o una serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar uno o más pares de oligonucleótidos largos (p. ej., >50-100 nucleótidos) que contienen la secuencia deseada, con cada par conteniendo un segmento corto de complementariedad (p. ej., unos 15 nucleótidos) de manera que se forma un dúplex cuando el par de oligonucleótidos se anilla. La polimerasa de ADN se utiliza para extender los oligonucleótidos resultando en una única molécula de ácido nucleico de cadena doble por par de oligonucleótidos, que entonces se puede unir a un vector. Los ácidos nucleicos aislados de la invención también se pueden obtener por mutagénesis de, por ejemplo, una porción naturalmente presente de un polipéptido f40/7481.

Se puede decir que dos ácidos nucleicos o los polipéptidos que codifican tienen un cierto grado de identidad entre sí. Por ejemplo, se puede decir que un polipéptido f40/7481 y una variante biológicamente activa del mismo muestran un cierto grado de identidad. Las alineaciones se pueden ensamblar localizando secuencias cortas del polipéptido f40/7481 en el sitio web de Búsqueda de Información sobre Proteínas (PIR), seguido de un análisis con el algoritmo de la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (BLAST) "secuencias cortas casi idénticas" en el sitio web de NCBI.

Se puede determinar "la identidad porcentual de la secuencia" determinando el grado de identidad entre cualquier secuencia de búsqueda dada y una secuencia objeto o de referencia. Por ejemplo, se podrían hacer varias mutaciones en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. N° 1 y, a continuación, determinar la identidad porcentual de la secuencia entre la mutante (la secuencia de la búsqueda) y la SEC. ID. N° 1 (la secuencia objeto o de referencia), alineando las secuencias y contando el número de posiciones en las que la secuencia de la búsqueda difiere de la secuencia de referencia. Por ejemplo, si se quisiese mutar la SEC. ID. N° 1 eliminando un residuo en cada terminal y sustituyendo dos aminoácidos dentro de la secuencia, la secuencia de la búsqueda diferiría de la secuencia de referencia en cuatro posiciones y, por tanto, sería al menos un 94% (65/69) idéntica a la secuencia de referencia.

Para determinar la identidad de la secuencia en escenarios más complejos, se puede alinear una secuencia de ácido amino o ácido nucleico de la búsqueda con una o más secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos objeto, respectivamente, utilizando el programa informático ClustalW (versión 1.83, parámetros por defecto), que permite realizar alineaciones de secuencias de ácido nucleico o proteínas en toda su longitud (alineación global). Véase Chenna *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 31:3497-3500, 2003.

Los ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en el presente pueden incluir nucleótidos o aminoácidos heterólogos, respectivamente. Por ejemplo, las secuencias pueden incluir nucleótidos o aminoácidos que no son normalmente contiguos con las secuencias de arácnidos, incluyendo secuencias de otras especies.

En el presente también se proporcionan construcciones recombinantes y pueden ser utilizadas para transformar células a fin de expresar los polipéptidos presentes. Una construcción de ácido nucleico recombinante comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en el presente, operativamente unido a una región reguladora adecuada para expresar el fragmento de un polipéptido f40/7481 en la célula. En algunos casos, una construcción de ácido nucleico recombinante puede incluir un ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación, un gen o un fragmento de una secuencia de codificación o gen en una orientación antisentido, para que la cadena antisentido de ARN se transcriba. Se apreciará que algunos ácidos nucleicos pueden codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos determinada. La degeneración del código genético es bien conocida en el campo. Para muchos aminoácidos, hay más de un triplete de nucleótidos que sirve como codón para el aminoácido. Por ejemplo, los codones de la secuencia de codificación para un polipéptido f40/7481 se pueden modificar para obtener la expresión óptima en un organismo determinado, utilizando las tablas de preferencia codónica apropiadas para ese organismo.

También se proporcionan vectores que contienen ácidos nucleicos como los descritos en el presente. Un "vector" es un replicón, como un plásmido, fago, orcósmido, en el que se puede insertar otro segmento de ADN para lograr la replicación del segmento insertado. Por lo general, un vector es capaz de replicar cuando está asociado con los elementos de control apropiados. Entre los ramales principales del vector adecuados se incluyen, por ejemplo, los utilizados rutinariamente en el campo, tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, BACs, YACs o PACs. El término "vector" incluye vectores de clonado y expresión, así como vectores virales y vectores de integración. Un "vector de expresión" es un vector que incluye una región reguladora. Los vectores de expresión adecuados incluyen, a título meramente enunciativo, plásmidos y vectores virales obtenidos, por ejemplo, de bacteriófagos, baculovirus y retrovirus. Hay numerosos sistemas de expresión y vectores disponibles en el mercado, de compañías como

Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA), e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

5 Los vectores proporcionados en el presente también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación, regiones de unión al andamio cromosómico (SARs) y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable en una célula huésped. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia a biocidas, como resistencia a un antibiótico (p. ej., kanamicina, G418, bleomicina o higromicina). Como se ha señalado anteriormente, un vector de expresión puede incluir una secuencia marcadora diseñada para facilitar la manipulación o detección (p. 10 ej., purificación o localización) del polipéptido expresado. Las secuencias marcadoras, como la proteína fluorescente verde (GFP), glutación S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina o las secuencias marcadoras Flag™ (Kodak, New Haven, CT) se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado. Estos marcadores se pueden insertar en cualquier lugar del polipéptido, incluyendo en el terminal carboxilo o amino.

15 El vector también puede incluir una región reguladora. El término “región reguladora” se refiere a secuencias de nucleótidos que influyen en la iniciación o la velocidad de la translación o transcripción, y en la estabilidad y/o movilidad de un producto de la translación o transcripción. Las regiones reguladoras incluyen, a título meramente enunciativo, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, elementos de respuesta, sitios de reconocimiento de proteína, elementos inducibles, secuencias de unión de la proteína, regiones no sometidas a traslación (UTRs), 20 sitios de inicio transcripcional, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación e intrones.

En el presente documento, el término “operativamente unido” se refiere al posicionamiento de una región reguladora y una secuencia a transcribir en un ácido nucleico, a fin de influir en la transcripción o translación de esta secuencia. Por ejemplo, para poner una secuencia de codificación bajo el control de un promotor, el sitio de iniciación de la 25 traslación del marco de lectura traslacional del polipéptido se posiciona típicamente entre uno y unos 50 nucleótidos en sentido descendente del promotor. No obstante, un promotor se puede posicionar hasta unos 5.000 nucleótidos en sentido ascendente del sitio de iniciación de la traslación o unos 2.000 nucleótidos en sentido ascendente del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor típicamente comprende al menos un promotor central (basal). Un promotor también puede incluir al menos un elemento de control, como una secuencia potenciadora, un elemento en sentido 30 ascendente o una región de activación en sentido ascendente (UAR). La elección de los promotores a incluir depende de varios factores incluyendo, a título meramente enunciativo, la eficiencia, selectabilidad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión preferencial del tejido o la célula. Para una persona con conocimientos en el campo, el hecho de modular la expresión de una secuencia de codificación seleccionando y posicionando convenientemente los promotores y otras regiones reguladoras con respecto a la secuencia de codificación es una 35 cuestión rutinaria.

*Métodos de tratamiento:* Por lo general, los polipéptidos revelados en el presente son útiles en la profilaxis y el tratamiento de estados en los cuales un evento adverso está provocado por una excesiva contracción del músculo liso. Estos incluyen condiciones donde la motilidad gástrica es demasiado elevada; condiciones urológicas o ginecológicas como una vejiga hiperactiva o la disfunción del suelo pélvico; y la disfunción eréctil. “Profilaxis” 40 significa un síntoma de un estado que mejora antes de que el síntoma sea problemático. Así, un tratamiento profiláctico puede retardar la aparición del síntoma o síntomas de un estado o reducir la gravedad de un síntoma posteriormente desarrollado. “Tratamiento” o “tratando” se aplica más habitualmente para indicar que la intervención ocurre después de que un síntoma sea perceptible o problemático. En el presente documento, “terapia” puede significar la abolición de los síntomas de un estado o una reducción en la frecuencia o gravedad de los síntomas de tal estado después de su aparición. 45

Los presentes métodos pueden incluir un paso en el que un médico u otro proveedor de asistencia sanitaria determine si un sujeto es susceptible de tratamiento. Por consiguiente, en el caso de la DE, los métodos pueden incluir el paso de identificar a un paciente que no puede conseguir una erección funcional, eyaculación o ambas cosas. La DE se confirma típicamente al menos seis meses después de un diagnóstico clínico (véase NIH Consensus on Impotence, J. Am. Med. Assoc. 270:83-90, 1993). 50

A pesar de que los presentes métodos están claramente diseñados para el tratamiento de los humanos, pueden utilizarse para tratar a animales en algunos casos. Por ejemplo, se pueden utilizar para tratar la impotencia en 55 animales en peligro de extinción o cuando su descendencia es particularmente valiosa (p. ej., la descendencia de un caballo de carreras). Administración y formulación: Los polipéptidos descritos en el presente se pueden administrar a un mamífero. Por lo general, los polipéptidos se pueden suspender en un portador farmacéuticamente aceptable (p. ej., suero fisiológico o una solución tampón) para facilitar su administración. La encapsulación de los polipéptidos en un vehículo de administración adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede 60 aumentar la eficiencia de la administración. Como sucede con otros terapéuticos de proteína o a base de proteína, los polipéptidos descritos en el presente pueden ser administrados dentro de un hidrogel o una formulación a base de lípidos. Los métodos para administrar polipéptidos de esta forma son conocidos en el campo.

Los polipéptidos de la invención se pueden formular en sistemas diseñados para la administración de fármacos de 65 péptidos incluyendo, a título meramente enunciativo, microesferas biodegradables y no degradables, liposomas, esferas de gel, nanoesferas, niosomas, microcápsulas, nanocápsulas, implantes inyectables, hidrogeles controlados

por difusión y otros sistemas hidrófilos, microemulsiones y emulsiones múltiples, y el uso de iontoforesis o electroporación, parches transdérmicos de macroflujos.

La administración de fármacos en el colon ha adquirido una mayor importancia no solamente para la administración de los fármacos para el tratamiento de enfermedades locales asociadas con el colon, pero también por su potencial para la administración de proteínas y péptidos terapéuticos. Para maximizar la administración colónica, un fármaco necesita ser protegido frente a la absorción y/o el entorno del tracto gastrointestinal (TGI) superior y, posteriormente, liberado abruptamente en el colon proximal.

Las presentes composiciones se pueden hacer combinando cualquiera de los polipéptidos proporcionados en el presente (o combinaciones de los mismos) con uno o más portadores farmacéuticos aceptables. Estos portadores pueden incluir, a título meramente enunciativo, soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones estériles. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos incluyen el aceite mineral, glicol de propileno, glicol de polietileno, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. Los portadores acuosos incluyen, a título meramente enunciativo, agua, alcohol, suero y soluciones tampón. También puede haber presentes conservantes, aromatizantes y otros aditivos como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes (p. ej., galato de propilo), agentes quelantes, gases inertes y similares.

Independientemente de su fuente original o de la manera en la que se hayan obtenido, los polipéptidos de la invención se pueden formular de acuerdo con su uso. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden formular dentro de composiciones para la aplicación a células en cultivo de tejido o para la administración a un paciente. Cuando se emplean como farmacéuticos, las composiciones presentes se pueden preparar de cualquier manera conocida en el campo farmacéutico y se pueden administrar por diversas vías, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo la administración en las membranas mucosas, incluyendo la administración intranasal y rectal, así como la administración en la piel que recubre el pene), pulmonar (p. ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo a través de un nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), ocular, oral o parenteral. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos, polvos y similares. Los portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleaginosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. A pesar de que probablemente sean preferibles las formulaciones orales o tópicas, la administración parenteral es viable e incluye la infusión o inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

Para realizar las composiciones de la invención, el ingrediente activo se mezcla típicamente con un excipiente, se diluye con un excipiente o se encapsula dentro de un portador en forma de, por ejemplo, una cápsula, bolsita, papel u otro contenedor. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido (p. ej., suero normal), que actúa como un vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Así, las composiciones pueden ser en forma de tabletas, píldoras, polvos, pastillas, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta un 10% en peso de los polipéptidos activos, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos empaquetados estériles. Como se sabe en el campo, el tipo de diluyente puede variar dependiendo de la vía de administración prevista. Las composiciones resultantes pueden incluir agentes adicionales, como conservantes. Los polipéptidos también se pueden introducir en una bomba, parche u otro dispositivo de administración del fármaco. Los portadores farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para el uso en formulaciones farmacéuticas, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin), un texto de referencia bien conocido en este campo y en la USP/NF (Farmacopea de los Estados Unidos y el Formulario Nacional del Medicamento estadounidense).

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen la lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato cálcico, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y celulosa de metilo. Las formulaciones pueden adicionalmente incluir agentes lubricantes, como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes como metil-benzoatos y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retrasada del ingrediente activo tras la administración al paciente, empleando procedimientos conocidos en el campo.

El creciente uso de proteínas terapéuticas expresadas recombinantemente o sintetizadas en el sector farmacéutico ha puesto de manifiesto cuestiones como su estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo y medios de administración eficaz que evitan efectos secundarios inmunogénicos adversos (Frakjaer y Otzen, Nat. Rev. Drug Discov. 4:298-306, 2005). Para abordar estas cuestiones, se han empleado, y se pueden emplear en el contexto de los polipéptidos descritos en el presente, modificaciones químicas controladas, tales como sustituciones, acilación y PEGilación.

Las composiciones se pueden formular en forma de una dosis unitaria, conteniendo cada dosis, por ejemplo, de unos 0,01 mg a unos 10 mg, 0,05 mg a unos 20 mg, 0,1 mg a unos 50 mg, de unos 0,1 mg a unos 40 mg, de unos 0,1 mg a unos 20 mg, de unos 0,1 mg a unos 10 mg, de unos 0,2 mg a unos 20 mg, de unos 0,3 mg a unos 15 mg,

de unos 0,4 mg a unos 10 mg, de unos 0,5 mg a unos 1 mg; de unos 0,5 mg a unos 100 mg, de unos 0,5 mg a unos 50 mg, de unos 0,5 mg a unos 30 mg, de unos 0,5 mg a unos 20 mg, de unos 0,5 mg a unos 10 mg, de unos 0,5 mg a unos 5 mg; de unos 1 mg a unos 50 mg, de unos 1 mg a unos 30 mg, de unos 1 mg a unos 20 mg, de unos 1 mg a unos 10 mg, de unos 1 mg a unos 5 mg; de unos 5 mg a unos 50 mg, de unos 5 mg a unos 20 mg, de unos 5 mg a unos 10 mg; de unos 10 mg a unos 100 mg, de unos 20 mg a unos 200 mg, de unos 30 mg a unos 150 mg, de unos 40 mg a unos 100 mg, de unos 50 mg a unos 100 mg del ingrediente activo. El término "formas de dosis unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Para preparar composiciones sólidas como tabletas, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se califica a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo se dispersa típicamente de forma uniforme por toda la composición, de modo que la composición se pueda subdividir fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente efectivas, tales como tabletas, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide después en formas de dosis unitarias del tipo anteriormente descrito que contienen, por ejemplo, de unos 0,1 a unos 500 mg del ingrediente activo de la presente invención.

Las tabletas o píldoras de la presente invención se pueden recubrir o componer de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender una dosis interior y un componente de dosis exterior, siendo este último una especie de revestimiento sobre la primera. Los dos componentes se pueden separar mediante una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interior pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Se pueden utilizar diversos materiales para estos revestimientos o capas entéricas, incluyendo diversos ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos, con materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden incorporar para la administración oral o mediante inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes convenientemente aromatizados, suspensiones acuosas u oleaginosas y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes orgánicos o acuosos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos aquí y/o conocidos en el campo. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía oral o respiratoria nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas se pueden aspirar directamente del dispositivo nebulizador o se puede acoplar el dispositivo nebulizador a una máscara facial o máquina de respiración de presión positiva intermitente. La solución, suspensión o composiciones en polvo se pueden administrar oral o nasalmente con dispositivos que administran la fórmula de manera apropiada.

Las presentes composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales o pueden ser filtradas estériles. Las soluciones acuosas se pueden envasar para el uso tal cual o liofilizarse, combinándose el preparado liofilizado con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de los preparados del compuesto típicamente se encontrará entre 3 y 11, por ejemplo, aproximadamente entre 5 y 9, entre 6 y 7, entre 7 y 8. La proporción o concentración de un compuesto de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo la dosis, las características químicas (p. ej., hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden proporcionar en una solución tampón fisiológica acuosa que contenga entre el 0,1 y el 10% aproximadamente en peso del compuesto para administración parenteral.

La dosis necesaria dependerá de la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la enfermedad del paciente, el tamaño del paciente, el peso, la superficie total, la edad y el sexo, otros fármacos que se estén administrando y la opinión del médico responsable. Las dosis adecuadas pueden estar en el rango de 0,01 -1.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Cabe esperar grandes variaciones en la dosis necesaria en vista de la variedad de objetivos celulares y las diferentes eficiencias de las distintas vías de administración. Las variaciones en esos niveles de dosis se pueden ajustar utilizando rutinas empíricas estándar para la optimización, bien conocidas en el campo. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (p. ej., 2 o 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150, o más veces). La encapsulación de los polipéptidos en un vehículo de administración adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de la administración.

La duración del tratamiento con cualquier compuesto proporcionado en el presente puede ser cualquiera: desde tan solo un día hasta toda la vida del huésped (p. ej., tratamiento intermitente en el transcurso de muchos años). Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido una vez a la semana (durante, por ejemplo, cuatro semanas hasta muchos meses o años); una vez al mes (durante, por ejemplo, tres a doce meses o durante muchos años); o una

vez al año durante un período de cinco años, 10 años o más. También cabe señalar que la frecuencia del tratamiento puede ser variable. Por ejemplo, los polipéptidos presentes se pueden administrar una vez al día o una, dos, tres veces a la semana, al mes o al año.

5 Se puede administrar una cantidad efectiva de cualquier composición proporcionada en el presente a un individuo que necesite tratamiento. El término "efectiva" utilizado en el presente se refiere a cualquier cantidad que induzca una respuesta deseada y que no provoque una toxicidad significativa en el paciente. Esta cantidad se puede determinar evaluando la respuesta del paciente tras la administración de una cantidad conocida de una determinada composición. Por otra parte, el nivel de toxicidad, si fuese el caso, se puede determinar valorando los síntomas clínicos del paciente, antes y después de administrar una cantidad conocida de una determinada composición. Cabe señalar que la cantidad efectiva de una determinada composición administrada a un paciente se puede ajustar con arreglo al resultado deseado, así como a la respuesta del paciente y al nivel de toxicidad. La toxicidad significativa puede variar para cada paciente en particular y depende de múltiples factores incluyendo, a título meramente enunciativo, el estado de la enfermedad del paciente, la edad y tolerancia a los efectos secundarios.

10 Alternativamente, un polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido se puede administrar en una célula apropiada del animal. Esto se puede conseguir, por ejemplo, utilizando un vehículo de administración de microcápsulas o micropartículas biodegradables, que tenga un tamaño diseñado para optimizar la fagocitosis de las células fagocíticas, como los macrófagos. Por ejemplo, se pueden utilizar micropartículas PLGA (poli-lactida-co-glicolida) de unos 1-10µm de diámetro. El polinucleótido está encapsulado en estas micropartículas, que son recogidas por macrófagos y gradualmente biodegradadas dentro de la célula, liberando así el polinucleótido. Una vez liberado, el ADN se expresa dentro de la célula. Un segundo tipo de micropartícula está diseñado para no ser recogido directamente por las células, sino para servir principalmente como depósito de liberación lenta del ácido nucleico que es recogido por las células tras la liberación de la micropartícula a través de la biodegradación. Estas partículas poliméricas deberían, por tanto, ser suficientemente grandes como para impedir la fagocitosis (es decir, mayores de 5 µm y preferiblemente mayores de 20 µm).

15 Otra forma de conseguir la absorción del ácido nucleico es utilizando liposomas, preparados con métodos estándar. Los vectores se pueden incorporar solamente en estos vehículos de administración o incorporarse con anticuerpos específicos para el tejido. Alternativamente, se puede preparar un conjugado molecular compuesto de un plásmido u otro vector unido a la poli-L-lisina con fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que se puede unir a un receptor de las células diana. La administración de «AND solo» (es decir, sin un vehículo de administración) en un punto intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio de conseguir la expresión *in vivo*.

20 En los polinucleótidos correspondientes (p. ej., vectores de expresión), la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína modificada con una metionina de iniciación u opcionalmente una secuencia diana se une operativamente a un promotor o combinación de potenciador-promotor. Los promotores y potenciadores se describen anteriormente y muchos son bien conocidos en el campo. Los polinucleótidos se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para la administración a sujetos humanos u otros mamíferos (p. ej., suero fisiológico). Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad del polinucleótido que es capaz de producir un resultado médicamente deseable (p. ej., una reducción de los síntomas motores clínicos) en un mamífero tratado. Como se sabe bien en el campo médico, la dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, la superficie total, la edad, el compuesto en particular a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se están administrando de forma concurrente. Las dosis variarán, pero una dosis preferible para la administración del polinucleótido es de aproximadamente  $10^6$  a  $10^{12}$  copias de la molécula del polinucleótido. Esta dosis se puede administrar repetidamente, si resulta necesario. Las vías de administración pueden ser cualquiera de las mencionadas anteriormente.

25 Cualquier método conocido en el campo se puede utilizar para determinar si se induce una determinada respuesta. Para la DE, es útil la información proporcionada por el paciente, junto con métodos clínicos que pueden valorar el estado de una determinada enfermedad, a fin de determinar si se induce una respuesta. Los métodos concretos utilizados para evaluar una respuesta dependerán de la naturaleza del trastorno subyacente del paciente, su edad y sexo, otros fármacos administrados y la opinión del médico responsable. Por lo general, se realizan algunos análisis de sangre para excluir una enfermedad subyacente, como diabetes, hipogonadismo y prolactinoma. Por lo general, la impotencia también está relacionada con una mala salud física, malos hábitos alimenticios, obesidad y más específicamente enfermedad cardiovascular, tal como enfermedad coronaria o enfermedad vascular periférica. Una forma útil y sencilla de distinguir entre la impotencia fisiológica y psicológica consiste en determinar si el paciente ha tenido alguna vez una erección. Si no la ha tenido nunca, es probable que el problema sea fisiológico; si solamente a veces (aunque sea pocas veces, podría ser fisiológico o psicológico. Algunos ejemplos de pruebas clínicas útiles para la DE incluyen el ultrasonido dúplex, que puede evaluar el flujo sanguíneo, la fuga venosa, signos de aterosclerosis y cicatrización o calcificación del tejido eréctil; función de los nervios del pene; tumescencia peneana nocturna (NPT); biotensiometría peneana; angiograma peneano; carversometría de infusión dinámica; medición de la presión en el cuerpo cavernoso; angiografía de sustracción digital y angiografía de resonancia magnética (MRA).

*Terapias de combinación:* Los polipéptidos de la invención son útiles cuando se administran en composiciones farmacéuticas, sea como monoterapia o bien conjuntamente con otros agentes (p. ej., otros tratamientos para la DE). Los inventores han descubierto un efecto sinérgico del polipéptido presente sobre el citrato de sildenafil inhibidor de PDE5 (Viagra®). Por consiguiente, las composiciones presentes pueden incluir un inhibidor de PDE5 y pueden resultar en un efecto sinérgico. Por tanto, la combinación de los dos agentes puede provocar un efecto terapéutico igual o mayor que el que se consigue con una única dosis de cualquiera de los agentes administrados en monoterapia y/o un mayor efecto terapéutico a una dosis inferior de uno o más de los agentes del que se conseguiría con un único agente administrado como monoterapia.

Más concretamente, los polipéptidos de la invención se pueden administrar conjuntamente con otras terapias para el tratamiento de la disfunción eréctil, tales como los agentes farmacéuticos estándar de tipo molécula pequeña, biofarmacéuticos (p. ej., anticuerpos o inmunoterapias relacionadas con anticuerpos, siRNAs, shRNAs, oligonucleótidos antisentido y otras moléculas inhibitoras de ARN, microARNs y terapéuticos de péptidos), cirugía o conjuntamente con cualquier dispositivo médico que se pueda utilizar para ayudar al paciente. A menos que el contexto indique lo contrario, utilizamos el término "agente" para referirnos generalmente a cualquier sustancia que afecta a una molécula diana (p. ej., un ligando o el receptor al que se une) o una región diana del cuerpo de una forma clínicamente beneficiosa (p. ej., para mejorar la capacidad de un sujeto para conseguir y mantener una erección). Por ejemplo, podemos referirnos a compuestos químicos como el citrato de sildenafil como "agentes". También podemos utilizar el término "compuesto" para referirnos a compuestos químicos convencionales (p. ej., moléculas inorgánicas u orgánicas pequeñas). El término "agente" también puede ser una proteína o molécula basada en una proteína, como un anticuerpo o ligando mutante. Otros agentes útiles incluyen los ácidos nucleicos o entidades basadas en ácidos nucleicos como los oligonucleótidos antisentido o moléculas de ARN que median el ARN interferente (RNAi, por sus siglas en inglés) y los vectores utilizados para su administración.

Más concretamente, los polipéptidos de la invención se pueden administrar junto con agentes farmacológicos que actúan para aumentar y mantener elevadas concentraciones locales de cGMP en el cuerpo cavernoso. Las terapias ampliamente utilizadas para la DE lo consiguen mediante la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 de cGMP (PDE5), una enzima que es responsable de la degradación de cGMP. Algunos inhibidores potentes y selectivos de PDE5 incluyen, por ejemplo, Viagra™ (sildenafil), Cialis™ (tadalafil), y Levitra™ (vardenafilo). Los polipéptidos de la invención se pueden administrar junto con un inhibidor de PDE5, por ejemplo, l-[4-etoxi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo [4,3-d]pirimidin-5-il)fenilsulfonil]-4-metilpiperazina (sildenafil); (6R-trans)-6-(1,3-benzodioxol-5-il)-2,3,6,7-tetrahidro-2H-piridino[3,4-b]indole-1,4-dione (tadalafil); o 4-[2-etoxi-5-(4-etilpiperazin-1-il)sulfonil-fenil]-9-metil-7-propil-3,5,6,8-tetrazabicyclo[4.3.0]nona-3,7,9-trien-2-ona (vardenafilo). La combinación de polipéptido y, por ejemplo, un inhibidor de PDE5 puede provocar un efecto sinérgico. Por tanto, la combinación de los dos agentes puede provocar un efecto terapéutico igual o mayor que el que se consigue con una única dosis de cualquiera de los agentes administrados en monoterapia y/o un mayor efecto terapéutico a una dosis inferior de uno o más de los agentes del que se conseguiría con un único agente administrado como monoterapia. El polipéptido o polipéptidos y los demás agentes, por ejemplo, un inhibidor de PDE5 se pueden administrar de forma concurrente o secuencial. En caso de administración concurrente, el polipéptido y el inhibidor de PDE5 se pueden formular en una única composición farmacéutica. En caso de administración secuencial, el polipéptido se puede administrar antes o después del inhibidor de PDE5 y la administración de la dosis se puede separar por intervalos de minutos, horas, días o semanas.

Los polipéptidos también se pueden administrar a un paciente que está recibiendo o ha recibido otros tratamientos para la DE. Estos incluyen: Prostaglandinas (alprostadilo), administradas mediante inyección de aguja o como un supositorio intrauretral, terapia de sustitución hormonal (p. ej., testosterona); dispositivos de inflado de vacío, bombas peneanas, cirugía vascular, implantes peneanos. Ejercicios de kegel, asesoramiento psicológico y terapia sexual.

Se han descrito diversas realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que se pueden realizar diversas modificaciones sin desviarse del espíritu o del alcance de la invención. Por consiguiente, otras realizaciones se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación del polipéptido f40/7841

El polipéptido f40/7841 ha sido purificado a partir del veneno bruto obtenido de arañas adultas hembra de la especie chilena *Latrodectus mactans*. Las arañas ayunaron durante 20 días para aumentar la concentración de toxina en las glándulas venenosas y posteriormente se expusieron a un entorno frío (-20°C) antes de la recogida. Los quelíceros (es decir, las partes de la boca que contienen las glándulas venenosas) se extrajeron con unas pinzas y se transfirieron a un tubo de Eppendorf que contenía una solución salina (PBS) (PBS: 0,1 mM NaH<sub>2</sub>P<sub>0</sub><sub>4</sub>, 0,01 mM NaHPO<sub>4</sub>, 1,35 mM NaCl, pH 7.4) y se mantuvieron a una temperatura de -4°C. Cada conjunto de glándulas contenía aproximadamente 2 µl de veneno. Las muestras se almacenaron a -80°C. El extracto bruto se obtuvo por agitación ultrasónica y los restos se eliminaron mediante centrifugación a -20°C a 2000 rpm. Este método ilustra los métodos

para obtener un extracto bruto de veneno bruto de las arañas, que se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

5 El extracto bruto se fraccionó mediante cromatografía HPLC. En el proceso de HPLC, se utilizó una columna Vydac C18 (22 x 250), 300 Å, 15 m, con un sistema de solvente compuesto de solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O y un solvente B: 60 ACN/solvente A, con elución en un 1-100% B en gradiente de 99 minutos, a un flujo de 10 ml/min, a temperatura ambiente. La elución se controló en un detector visible/UV a una longitud de onda de 220 nm.

10 Todas las fracciones con concentraciones de proteína superiores a 0,2 mg/ml al morir por congelación fueron analizadas en LC/MS. Como se describe a continuación, la fracción de interés se identificó mediante ensayos *in vitro* (fragmentos del cuerpo cavernoso de la rata) e *in vivo* (en ratón).

15 Las fracciones que mostraban actividad *in vitro* se analizaron a través de un sistema LC/ESI-MS Waters de espectro masivo, compuesto por un módulo de separación Alliance modelo 2690, un detector fotodiódico modelo 996, un inyector automático con capacidad para 120 muestras y un espectrómetro Micromass modelo 2 MD. El sistema se controló con un Compaq modelo AP200. Para las fracciones que tenían el mismo tiempo de retención o que tenían un perfil cromático similar y el mismo peso molecular se determinaron por el sistema detector de masa (se utilizó barrido fisiológico) que estaba controlado por una unidad informática. Los polipéptidos (o la fracción seleccionada de HPLC) se diluyeron en AcOH/H<sub>2</sub>O al 20%, hasta una concentración de 3 mg/ml. Las muestras fueron cromatografiadas en una columna C18 Waters Nova-Pak (2.1 x 150) 60Å, 3,5m, con una combinación solvente de un solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O y un solvente B: 0,1 TFA en 60% o 75% de ACN/H<sub>2</sub>O, utilizando un gradiente de 5% a 95% de B en 20 o 30 minutos, con un flujo de 0,4 ml/min a una longitud de onda de 190-300 nm y un intervalo de masa de 500-3930 daltons (Da).

25 En la Figura 4 se muestra un perfil cromatográfico de HPLC/mass Waters. Las condiciones experimentales específicas fueron la columna: Waters Nova-Pak C18 (2,1 x 150 mm), 60 Å, 3,5 m; Solventes: A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O B: 0,1% TFA en 60 6 75% ACN/H<sub>2</sub>O; Gradiente: 5 a 95% de B en 20 6 30 min. 855 ; Flujo: 0,4 ml/min; Longitud de onda: 190-300 nm; Volumen inyectado: 50 µL; Intervalo de masa: 500-3930 Da; Modo: "Electrospray" Positive 860; Flujo de nitrógeno: 4,1 L/h; Temperatura fuente: 150°C; Temperatura de evaporación: 400°C; Voltaje del cono: 36 V; Energía en caramal: 4 kV 865; Energía del extractor: 5 kV; Energía del multiplicador: 700 V; Resolución de bajo peso molecular: 15,6; Resolución de alto peso molecular: 8,7. La Figura 4 muestra los perfiles de extractos purificados; la estrategia de HPLC-MS resultó en un compuesto único de alta pureza correspondiente al producto f40/7841. Se puede observar claramente que el polipéptido se eluyó a 17,25 s y en el gráfico anterior correspondía a la expansión de la escala 1:1 en un tiempo de análisis de la muestra de 30 s.

35 La masa molecular de la fracción f40/7841 fue uniforme con el valor obtenido mediante HPLC. Como se muestra en la Figura 5, el polipéptido eluido tenía un perfil cromatográfico de 7841 Da. La secuencia del polipéptido se determinó mediante degradación de Edman, tras la desprotección del N-terminal bloqueado con aminopeptidasa de piroglutamato; la secuencia se confirmó mediante HPLC y MALDI-MS de péptidos tripticos.

40 Las fracciones se congelaron hasta la muerte y se determinó la concentración de proteína

45 utilizando el método Bradford, la actividad se expresó en mg de proteína por fracción/100 mg de extracto bruto. La fracción activa seleccionada para un posterior análisis de designó f40/7841. Las fracciones fueron almacenadas en frío.

Ejemplo 2: Ensayo *in vitro* de la relajación del músculo liso del cuerpo cavernoso

50 El efecto de los polipéptidos sobre la actividad contráctil del cuerpo cavernoso *in vitro* se analizó en el tejido del cuerpo cavernoso obtenido de ratas macho adultas Wistar. El tejido se posicionó verticalmente en una cámara orgánica aislada bajo las condiciones que se describen a continuación. Las ratas adultas Wistar, con edades comprendidas entre 1,5 y 2 meses, de 250-350 gramos de peso fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y el pene se diseccionó desde la base, dando aproximadamente 2 cm de tejido aislado. El tejido peneano se diseccionó bajo una lente de aumento estereoscópica Zeiss STEMI DV4. Se retiró suavemente la túnica albugínea, que protege el cuerpo cavernoso y esponjoso. Los cuerpos cavernosos se retiraron desde su posición central, obteniendo dos fragmentos de igual longitud y diámetro, que fueron transferidos a una solución fisiológica Tyrode convenientemente oxigenada (mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), a 37°C a pH 7.4. La composición de la solución Tyrode se muestra en la Tabla 1.

60

Tabla 1. Solución Tyrode

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (Mn)	PESO (g/mol)	MOLECULAR	SOLUCIÓN PARA LITROS (g)	2
NaCl	137,00	58,44		320,240	
KCl	5,40	74,56		16,104	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,70	147,02		15,818	
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,50	203,30		4,066	
NaHC03	11,90	84,01		39,988	
NaH <sub>2</sub> P04 x H <sub>2</sub> O	0,45	137,99		2,484	
Glucosa x 1 H <sub>2</sub> O	5,55	198,17		—	

- 5 Las sales NaCl, CaCl<sub>2</sub>x 2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O y NaHCO<sub>3</sub> se adquirieron a Winkler-USA; KCl a Fluka Chemika-Switzerland; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, Glucosa x 1 H<sub>2</sub>O a Merck-Germany.

10 El ensayo se realizó en una cámara orgánica aislada de 4/5 ml LSI LETICA como se muestra en la Figura 6a, con un primer plano en la Figura 6b. Los segmentos cavernosos se ataron con seda por su extremo distal y proximal y se sumergieron en la solución fisiológica Tyrode en las cámaras. La parte distal se ató a la barra de conexión y la porción proximal se conectó al transductor de contracción isométrica (TRI 201/0-25g) conectado a un instrumento de interface analógico/digital Power Lab/4SP Ad, lo que hizo posible almacenar y analizar las señales registradas mediante el uso del software Chart 5. Básicamente, los fragmentos estaban conectados a un transductor de tensión analógico, que transfería su señal a una interfase Power Lab-Letica, que registra, elabora gráficos y almacena la información generada por la preparación fisiológica en fuerza/tiempo (escala g/min).

15 Antes de someter a ensayo los polipéptidos, las muestras aisladas del cuerpo cavernoso se estabilizaron como sigue. Después de colocar el cuerpo cavernoso en la cámara orgánica aislada, se aplicó una tensión de 0,5 g a una velocidad normal (proporción 1:1) durante una hora. Durante este tiempo, la tensión basal y la oxigenación (10 ml/min) se mantuvieron constantes. Después de los primeros 20 minutos, la preparación se lavó utilizando solución fisiológica Tyrode, se fijó la tensión y se repitió el procedimiento cada 20 minutos hasta 4 veces. En el proceso de lavado final, en el sistema de control Chart 5, la velocidad de registro se modificó de 10x a 1x.

25 Ejemplo 3: El efecto de f40/7841 sobre la actividad contráctil del cuerpo cavernoso

30 La capacidad de f40/7841 para inducir la relajación del músculo liso se sometió a ensayo en el ensayo del cuerpo cavernoso descrito en el Ejemplo 2, en presencia de 50 μM de fenilefrina, un agonista farmacológico del receptor alfa-adrenérgico que induce la contracción del músculo liso. Como se muestra en la Figura 7, el tratamiento del cuerpo cavernoso con fenilefrina produjo una respuesta contráctil fásica seguida de una respuesta tónica mantenida con firmeza durante los primeros 20 minutos, que disminuyó ligeramente en los últimos puntos temporales (círculos). La adición del extracto total de veneno de *Latrodectus mactans* a 2 μg/ml en la cámara, en presencia de fenilefrina (50 μM) provocó una caída de la fuerza contráctil de alrededor del 10%, 40 minutos después de la adición. El gráfico muestra los resultados de 56 mediciones.

35 La Figura 8 muestra un experimento similar en el que los fragmentos del cuerpo cavernoso fueron tratados con fenilefrina, como anteriormente, en presencia de la fracción purificada f40/7841 a 0,1 μg/ml. Para determinar el potencial de relajación fue necesario inducir primero una respuesta contráctil máxima (control), en presencia de un fármaco que activa los receptores α-adrenérgicos, fenilefrina (50 μM). Los resultados obtenidos de la serie experimental son analizados estadísticamente con una significancia estadística de P<0,05, y se recogieron en gráficos con el software GraphPad Prim,V,3,02.

40 Ejemplo 4: Registros analógicos de la actividad de relajación de f40/7841

45 Un registro analógico típico de una respuesta de un fragmento del cuerpo cavernoso contraído con 50 μM de fenilefrina se muestra en la Figura 9. Los fragmentos de tejido se recogieron como se describe en el Ejemplo 2, se colocaron en la cámara orgánica y se estabilizaron durante una hora. El rastro basal se obtuvo después de una hora con una tensión de inicio aplicada de 0,5 g en un entorno fisiológico a pH7,4 y una combinación de gas de 95%O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Tras la adición de fenilefrina a una concentración final de 50 μM, se produjo una rápida contracción fásica, seguida de un componente tónico que se mantuvo en el tiempo. La calibración del instrumento fue de 0,5 g.

50 La Figura 10 muestra un registro analógico de una respuesta de un fragmento de cuerpo cavernoso contraído con fenilefrina y el tratado con el polipéptido f40/7841. Un fragmento aislado de cuerpo cavernoso se trató con fenilefrina como anteriormente, durante 20 minutos, seguido de la adición del polipéptido f40/7841 a una concentración final de

2 µg/ml. La adición del polipéptido f40/7841 resultó en una rápida reducción de la contracción tónica. La calibración del instrumento fue de 0,5g,

Ejemplo 5: Efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico sobre la actividad de f40/7841

5 El papel del óxido nítrico en la actividad de relajación de f40/7841 se analizó tratando las muestras del cuerpo cavernoso con un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). La contracción de los fragmentos del cuerpo cavernoso se indujo con fenilefrina, como en el Ejemplo 4, durante 10 minutos, seguida de la adición L-NAME a una concentración final de 10 mM. Cuando habían transcurrido otros 10 minutos, se añadió el polipéptido f40/7841. Los rastros analógicos se muestran en la Figura 11, CH-1 = fenilefrina 5 µM + L-NAME 10mM+ F40/7841 0,2 µg/ml; CH-2= fenilefrina 5 µM + L-NAME 10mM+ F40/7841 0,02 µg/ml; y CH-3= fenilefrina 5 µM + L-NAME 10 mM+ F40/7841 2 µg/ml. Como sucediera en el Ejemplo 4, la adición de fenilefrina resultó en una rápida contracción del tejido del cuerpo cavernoso, en presencia del inhibidor de óxido nítrico. El polipéptido f40/7841 no provocó un descenso de la contracción, es decir que L-NAME bloqueó la capacidad de f40/7841 para relajar el tejido contraído. La calibración del instrumento fue de 0,5 g.

La Figura 12 muestra un experimento similar en el que los fragmentos del cuerpo cavernoso fueron tratados con fenilefrina, seguido de la adición del f40/7841 en presencia (rastro superior) y ausencia (rastro inferior) de L-NAME. Como sucediera en el experimento mostrado en la Figura 11, la inhibición de la sintasa de óxido nítrico eliminó la capacidad del polipéptido f40/7841 para inducir la relajación del cuerpo cavernoso.

Ejemplo 6: Efecto de la atropina sobre la actividad de relajación de f40/7841

25 Se estudió el papel del receptor de acetilcolina en la actividad de relajación de f40/7841, tratando las muestras del cuerpo cavernoso con el antagonista del receptor de acetilcolina muscarínico, atropina. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 13. CH-1 = fenilefrina 5 µM + atropina 1 µM + F40/7841 1 µg/ml; CH-2= fenilefrina 5µM + F40/7841 1 µg/ml + atropina 1 µM. La contracción de los fragmentos del cuerpo cavernoso se indujo con fenilefrina, como en el Ejemplo 4, durante 40 minutos, seguida de la adición de atropina a una concentración final de 1 µM (rastro superior). La respuesta tónica se redujo gradualmente con el tiempo en presencia de atropina. La muestra del rastro inferior también recibió la adición del polipéptido f40/7841. La capacidad del polipéptido f40/7841 para inducir la relajación se atenuó en presencia de atropina.

35 Se obtuvieron unos resultados similares cuando se añadió la atropina antes de la fenilefrina. En el experimento mostrado en la Figura 14, las muestras del cuerpo cavernoso se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 4, se estabilizaron durante una hora y, posteriormente, se incubaron en 1 µM de atropina, seguida de la adición de fenilefrina a una concentración final de 50 µM. Se observó la respuesta contráctil rápida típica tras la adición de fenilefrina. Veinte minutos después de la adición de fenilefrina, se añadió el polipéptido f40/7841 a una concentración final de 2 µg/ml. Como sucedió en el experimento mostrado en la Figura 13, se atenuó la capacidad del polipéptido f40/7841 para inducir la relajación en presencia de atropina. La calibración del instrumento fue de 0,5 g.

Ejemplo 7: Activación de receptores de acetilcolina nicotínica (nAChR) en células PC12 transfectadas por f40/7841

45 La posibilidad del polipéptido f40/7841 para activar los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) se sometió a ensayo mediante un experimento de pinzamiento de membrana del conjunto celular de las células PC12 que habían sido modificadas para expresar el receptor de acetilcolina nicotínico 7 alfa ( $\alpha_7$ nACh). Las células PC 12 se transfectaron y cultivaron durante 48 horas en un 80% de MEM. La solución contenía (mM): 150 NaCl, 5,4 KCl, 2,0 CaCl<sub>2</sub>, 1,0 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 Hepes (7,4), 2 mM, y 10% de suero bovino fetal a 37°C, (Trifaro *et al*, *In vitro Cell Dev. Biol.*, 1990). Las células se incubaron durante una hora a 22°C, antes de comenzar los experimentos. Los actuales cambios se detectaron a través de un sistema de pinzamiento de membrana del conjunto celular mediante un amplificador Warner PC-5013 y un microscopio invertido Olympus de 9° 70. La potencia de la membrana se ajustó a -60 mV; la corriente se registró a intervalos de 5 µs y se filtró a 2 Kh utilizando un ordenador conectado a un sistema de grabación a través de una tarjeta de adquisición Digidata 9,0 (Axon Instrument, Inc) y el software PC 9 (Axon Instrument, Inc). La solución tampón para los ensayos con los péptidos se mantuvo refrigerada a 4°C y las micropipetas contenían una solución interna de: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, y 10 mM HEPES, pH 7.4.

El polipéptido purificado f40/7841 se purificó de acuerdo con el método del Ejemplo 1. Se diluyeron 0,1 mg del polipéptido en 100 µl de PBS estéril a pH 7.4. El polipéptido diluido se dispersó en partes alícuotas de 25 µl en tubos de Eppendorf y se mantuvo refrigerado a -20°C. Todas las manipulaciones del péptido se realizaron bajo una campana de flujo laminar.

Se utilizaron caramales de borosilicato con filamentos BF150-117-15. Los caramales se manejaron en contenedores originales y los extremos se pulieron con un equipo BF 150-117-15 para proporcionar máxima adhesión de la

membrana frente a la presión negativa. Los diámetros de las puntas eran de 1 urn y la resistencia de 5-8 MΩ. Los caramales se sometieron a una inspección visual antes del uso.

5 Durante todo el análisis del pinzamiento de membrana del conjunto celular, las células se manejaron con cuidado, utilizando micromanipuladores a través de presión o succión negativa; la formación de un sello se anotó como un incremento en la resistencia eléctrica. Cuando el equipo estaba en 0V, se generaban 10 mV, observando en un microscopio virtual integrado en el programa del equipo de la pantalla del ordenador, una corriente de amplitud variable o de impulsos. Este impulso de forma cuadrada fue un reflejo de la resistencia entre el entorno y el electrodo. Al tocar la célula, la corriente descendía y la amplitud del impulso de forma cuadrada se reducía de forma significativa. Este cambio en el osciloscopio demostró que la punta había tocado la membrana y que las condiciones eléctricas habían cambiado como resultado del desarrollo de una resistencia.

15 La respuesta electrofisiológica inducida por la activación del canal nicotínico en presencia de un compuesto de control positivo, 10 μM de carbacol, un agonista colinérgico, se muestra en la Figura 15. Como se muestra en el rastro superior, el tratamiento con carbacol de las células PC12 transfectadas en α7AChR resultó en una rápida inducción de una corriente de potasio de 10 pA, seguida de una corriente de cola. El gráfico también demuestra que la corriente capacitiva no se modificó durante el experimento, lo que indica que la preparación no perdió resistencia y que el sello de la membrana celular se mantuvo durante el período de registro.

20 La respuesta electroquirúrgica inducida por la activación del canal nicotínico en presencia del polipéptido f40/7841 se muestra en la Figura 16. El polipéptido f40/7841 a una concentración de 0,1 μg/ml actuó como un agonista farmacológico sinérgico sobre el preparado, produciendo una rápida corriente de potasio de 500 pA, seguida de una corriente de cola. El gráfico inferior demostró que la corriente capacitiva no se modificó durante el experimento, lo que indica que el preparado no perdió resistencia y que el sello de la membrana celular se mantuvo durante el período de registro. Los datos de la Figura 16 indicaban que el polipéptido f40/7841 indujo una actividad colinérgica específica (α7nACh), es decir una corriente de potasio que bloqueó una corriente de calcio hacia el entorno intracelular.

30 Ejemplo 8: Determinación de la concentración de calcio intracelular

Para confirmar que el polipéptido f40/7841 no tenía ningún efecto sobre el flujo de calcio, se trataron mioblastos C2C12 con el polipéptido f40/7841 y se sometieron a ensayo los niveles de calcio intracelulares, utilizando el fluorocromo sensible al calcio Fluo-3AM. Para las mediciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular, se utilizó un microscopio Confocal LSM 510 Meta Confocal (Zeiss, Jena, Alemania) con una excitación de línea latente de 488 nm. Las células C2C12 se colocaron en placas de cultivo de 60 mm (Nalge Nunc International, Rochester, NY) y se cultivaron durante 48 horas, conteniendo cada placa unas 250.000 células. Las células se cargaron con fluorocromo de una concentración de 4 μM fluo-3AM (Sigma) en 0,5% Me<sub>2</sub>SO y 0,1% de ácido plurónico F-127 durante 30 minutos a 37°C; se lavaron tres veces con una solución Dulbecco modificada con un 10% de suero bovino fetal y se devolvieron a la incubadora.

40 La fluorescencia de Fluo-3AM se estimuló a 488 nm y se midió a 515 nm utilizando un filtro de paso de banda. Se midió el Ca<sup>2+</sup> intracelular durante 10 segundos, seguido de la adición de 1 μM del polipéptido f40/7841 y 1,5 mM de carbacol. Los cambios de Ca<sup>2+</sup> se controlaron durante dos minutos y las imágenes se tomaron cada 1,5 segundos. A continuación se añadió el ionóforo de calcio 4-Br-A23187 (5 μM) seguido de by 10 mM de EGTA para obtener la excitación máxima del calcio (Fmax) y la fluorescencia mínima (Fmin), respectivamente. La fluorescencia (F) del [Ca<sup>2+</sup>] intracelular obtenida con el polipéptido f40/7841 utilizado se calculó como sigue: [Ca<sup>2+</sup>] intracelular = Kd\* (\*F - F\*min)/(F\*max - \*F\*), asumiendo 450 nM, \*Kd\* para el fluo-3AM. Las concentraciones se calcularon en poblaciones celulares que contenían al menos 10 células.

50 Una fotografía de las células C2C12 activadas con el polipéptido f40/7841 se muestra en la parte izquierda de la Figura 17. Se tomaron imágenes secuenciales cada 10 mseg. Como se muestra en el gráfico del centro de la Figura 17, el polipéptido f40/7841 no indujo un flujo de calcio en las células C2C12. La adición del compuesto de control positivo, el ionóforo de calcio 4-Br-A23187 provocó una pronunciada punta de la fluorescencia que se eliminó mediante la adición del quelante de calcio EGTA.

55 Ejemplo 9: Efecto sinérgico del citrato de sildenafil y f40/7841

La contracción de los fragmentos del cuerpo cavernoso se indujo con 50 μM de fenilefrina, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Figura 1, la posterior adición de citrato de sildenafil (▲ triángulos) a una concentración final de 1 μM provocó un lento descenso de la respuesta contráctil durante un período de 25-30 minutos. La coadición de f40/7841 (■ cuadrados) a una concentración final de 2 μg/ml provocó una reducción significativa de la respuesta contráctil, en comparación con el citrato de sildenafil solo. Por otra parte, típicamente una concentración de 100 μM de citrato de sildenafil solo fue necesaria para observar un índice de relajación comparable al observado con el polipéptido f40/7841 y solo 1 μM de citrato de sildenafil, lo que sugiere que el polipéptido f40/7841 puede mejorar de forma significativa la acción del sildenafil.

65

Ejemplo 10: Diseño de los cebadores RT-PCR para el análisis del ARN de *Latrodectus mactans*

5 Para aislar los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido f40/7481 de la especie chilena *Latrodectus mactans*, se diseñaron cebadores basándose en la secuencia de la latrotoxina de la subespecie euroasiática *Latrodectus tredecimguttatus*. Los cebadores de ADN se seleccionaron basándose en la región conservada en LOCUS DQ011856. Las secuencias del cebador fueron las que se muestran a continuación:

10 Sentido: aTX 1F: 5'-GTTGCTGGTCAGGACTCTCTGG-3' (SEC. ID. N° 4)

Antisentido: aTXIR: 5' -TTTGGCCTCTTCT A A ATCTTTT ACG-3' (SEC. ID. N° 5)

Sentido: aTX2F: 5'-GCTTAAGCTTATCTGCATTGCCT-3' (SEC. ID. N° 6)

15 Antisentido: aTX2R: 5'-GACAACACCTTCCTTATGCAAATCTTC-3' (SEC. ID. N° 7).

Estos cebadores se utilizaron para el RT-PCR sobre el mRNA extraído de la araña chilena *Latrodectus mactans*. Como se muestra en la Figura 2, todas las combinaciones de cebadores menos una dieron un único fragmento; la señal más fuerte se obtuvo utilizando los cebadores aTX 1F y aTX2R.

20 Ejemplo 11: Ejemplo profético de ensayo *in vivo*

Ensayo *in vivo* de la DE: Los roedores y otros mamíferos típicamente utilizados en estudios de laboratorio se pueden utilizar para valorar las presentes composiciones. Por ejemplo, se puede preparar una composición farmacéuticamente aceptable que incluye un polipéptido que tiene o incluye la secuencia de SEC. ID. N° 1 y administrarla (mediante, por ejemplo, inyección subcutánea o intraperitoneal) en ratas macho Fisher 344. Si se desea, se pueden realizar estudios paralelos con ratas jóvenes (de unos cuatro meses) y viejas (de unos 19 meses), tal y como se describe en Musicki *et al*, (J, Urology 174:1493-1496, 2003). Se pueden realizar experimentos con suero o "el vehículo solamente" en paralelo. La erección se puede valorar visualmente y se pueden configurar los estudios para una nueva evaluación de la refracción. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar rutinariamente (p. ej. 1-3 veces al día) durante un período de tiempo (p. ej., 2-4 semanas) y la estimulación eléctrica del nervio cavernoso se puede realizar para evaluar la erección peneana tras un período de reposo.

35 Ejemplo 12: Clonado profético del cADN del mRNA que codifica la SEC. ID. N° 1

Un clon de cADN de  $\alpha$ -latrotoxina de *L. mactans* se obtiene utilizando métodos de biología molecular estándar (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) J, Sambrook, P, MacCallum, D, Russell, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY). Para resumir, el producto de la PCR obtenido en el experimento descrito en el Ejemplo 10 se clona y secuencía, y la secuencia de ADN se alinea con la  $\alpha$ -latrotoxina de la subespecie euroasiática *Latrodectus tredecimguttatus*, así como las secuencias de AND de otras  $\alpha$ -latrotoxinas para confirmar que los cebadores se han anillado con el mRNA de la  $\alpha$ -latrotoxina. Si la secuencia es homóloga o idéntica a la de *L. tredecimguttatus*, se obtiene el clon de cADN en toda su longitud de dos maneras. Se diseñan conjuntos adicionales de cebadores solapados para generar productos de la PCR más largos, utilizando diversos métodos basados en la PCR, incluyendo, por ejemplo, la PCR inversa, RACE, seguida del aislamiento de los fragmentos de la PCR y la clonación directa, utilizando, por ejemplo, sistemas disponibles en el mercado como el kit de clonado QIAgen PCR. Alternativamente, se construye una librería de cADN de *L. mactans* y la secuencia clonada se utiliza para explorar la librería; los clones identificados son secuenciados para confirmar su identidad. Independientemente del método utilizado, los clones son secuenciados para confirmar que se ha aislado una secuencia de cADN en toda su longitud.

50 La secuencia de cADN resultante se inserta entonces en el sistema de cualquier vector útil para la expresión de proteína, por ejemplo, pET28 (Stratagene) que tiene un promotor de polimerasa T7 ARN. Los plásmidos resultantes se utilizan para transformar la bacteria BL 21 (Stratagene) utilizando un electroporador BIORAD. Los transformantes se cultivan en 2xYT hasta una densidad óptica de 2,0. A continuación, se induce la síntesis de la proteína con 1 nM de IPTG durante 3 horas a 37°C. La proteína expresada bacterianamente se purifica de acuerdo con el método de HPLC del Ejemplo 1.

55

**REIVINDICACIONES**

- 5 1, Un polipéptido sustancialmente puro que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEC. ID. Nº 1, a condición de que la secuencia de aminoácidos del polipéptido no sea la SEC. ID. Nº 2.
- 2, El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos varía de la SEC. ID. Nº 1 por el hecho de contener una o más sustituciones de aminoácidos,
- 10 3, El polipéptido de la reivindicación 2, donde la sustitución o sustituciones de aminoácidos comprenden una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras,
- 15 4, El polipéptido de la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido varía de la SEC. ID. Nº 1 por el hecho de contener una o más delecciones o inserciones de aminoácidos,
- 5, El polipéptido de la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos es al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% idéntica a la SEC. ID. Nº 1,
- 20 6, El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos se compone de la SEC. ID. Nº 1,
- 7, Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 8, Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7,
- 25 9, Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 8,
- 10, Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- 30 11, Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un polipéptido que se compone de una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEC. ID. Nº 1,
- 12, La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 11, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido varía de la SEC. ID. Nº 1 por el hecho de contener una o más sustituciones de aminoácidos,
- 35 13, La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 12, donde la sustitución o sustituciones de aminoácidos comprenden una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras,
- 40 14, La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 11, donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido varía de la SEC. ID. Nº 1 por el hecho de contener una o más delecciones o inserciones de aminoácidos,
- 45 15, La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 11, donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido es al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% idéntica a la SEC. ID. Nº 1,
- 16, La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 11, donde la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia heteróloga,
- 50 17, La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 10, u 11 a 16, que comprende además un segundo ingrediente farmacéuticamente activo,
- 18, La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 10, u 11 a 16, donde la composición está formulada para la administración oral,
- 55 19, La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 10, u 11 a 16, donde la composición está formulada para la administración parenteral,
- 60 20, La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 17, donde el segundo ingrediente farmacéuticamente activo es citrato de sildenafil,
- 21, La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 19, donde la administración parenteral es una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o transmucosa.

- 22, Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21 para utilizarla en un método de tratamiento de un sujeto que padece disfunción eréctil, comprendiendo dicho método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica,
- 5 23, La composición de la reivindicación 22, donde el método comprende además el paso de identificar a un sujeto que padece disfunción eréctil,
- 24, Un método para hacer el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho método el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 9, durante un tiempo y bajo condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- 10 25, El método de la reivindicación 24, comprendiendo también el paso de aislar el polipéptido de la célula huésped o del medio en el que se cultivó la célula huésped.

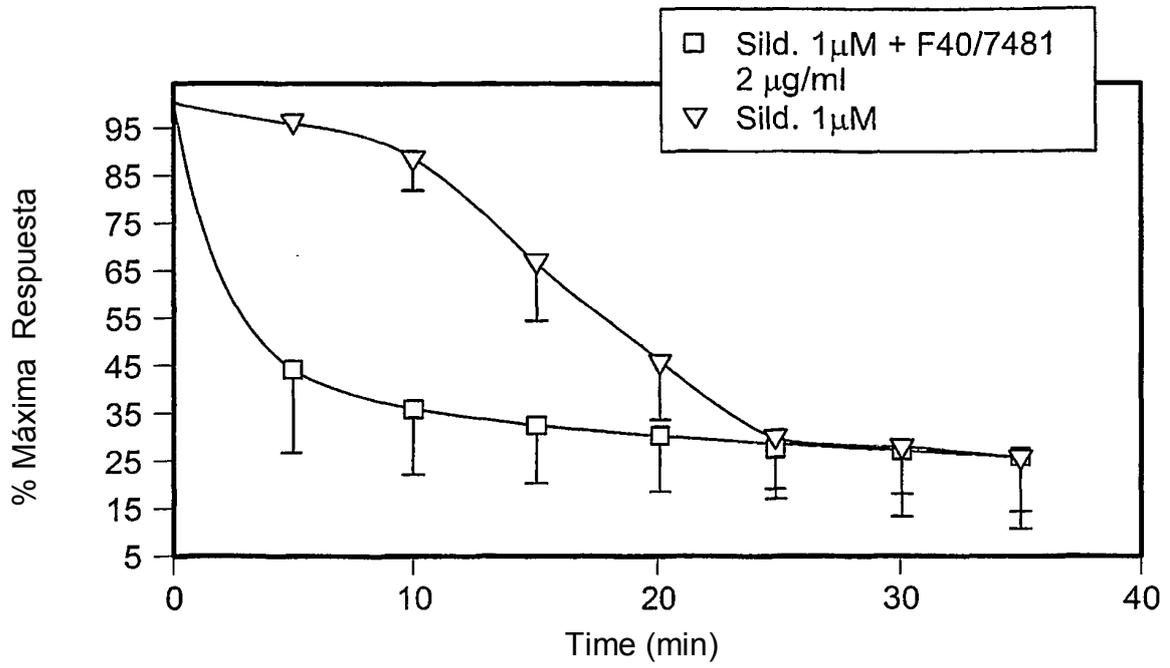


FIG. 1

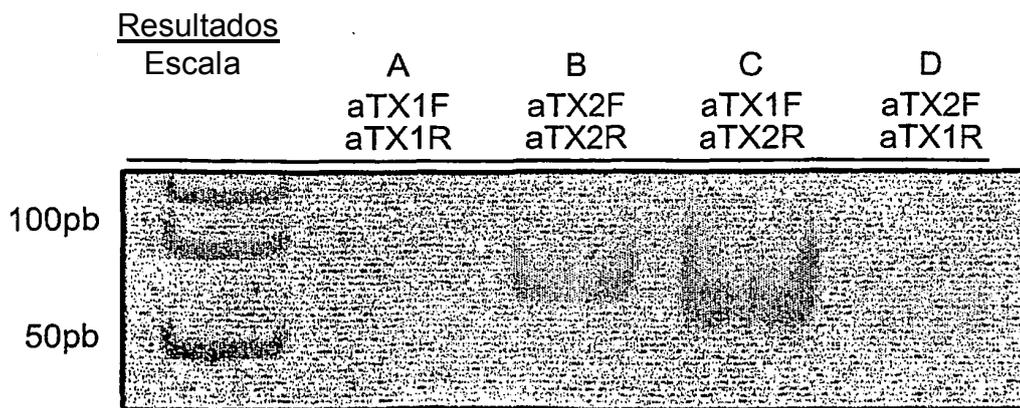


FIG. 2

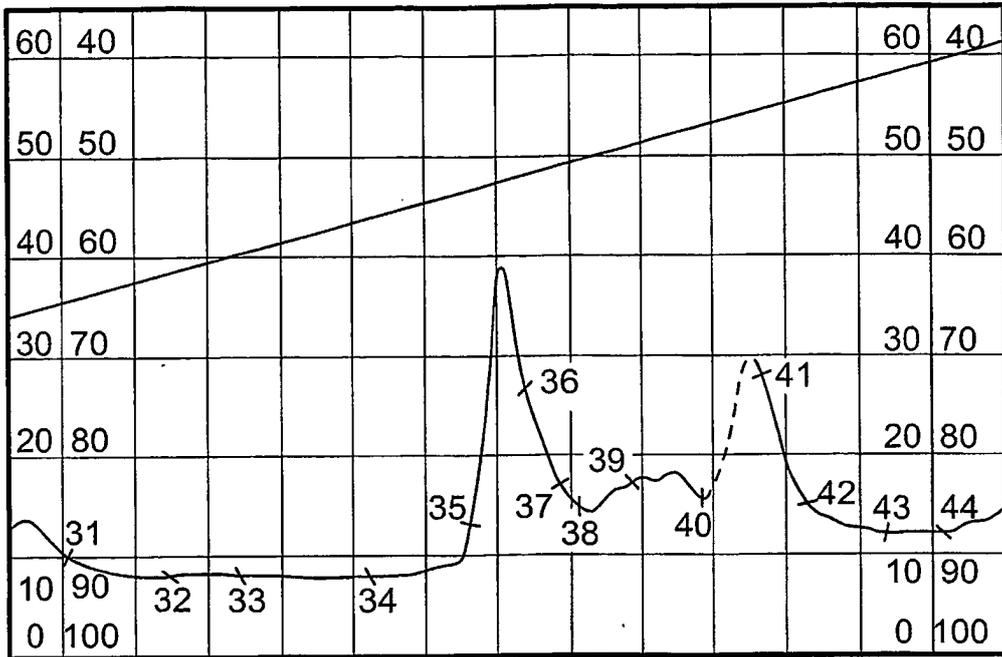


FIG. 3

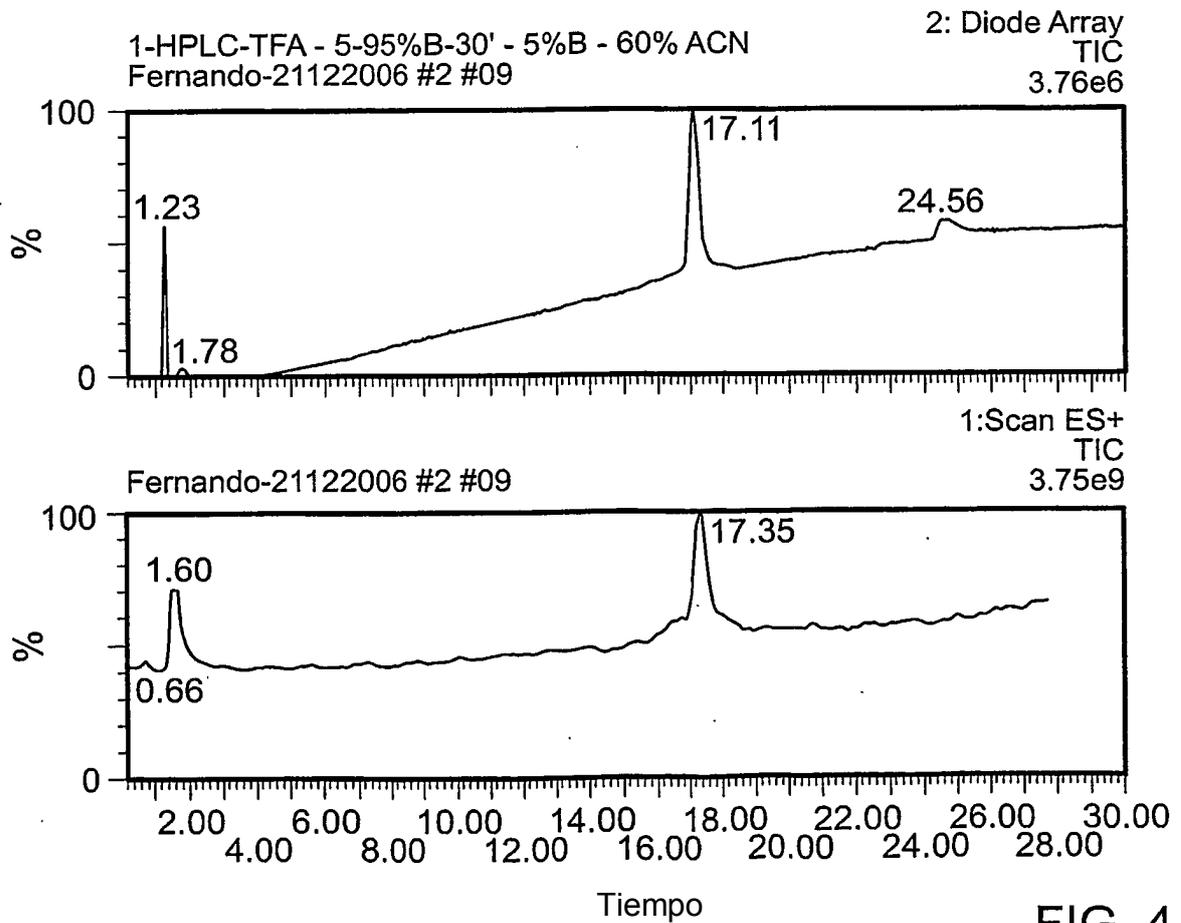
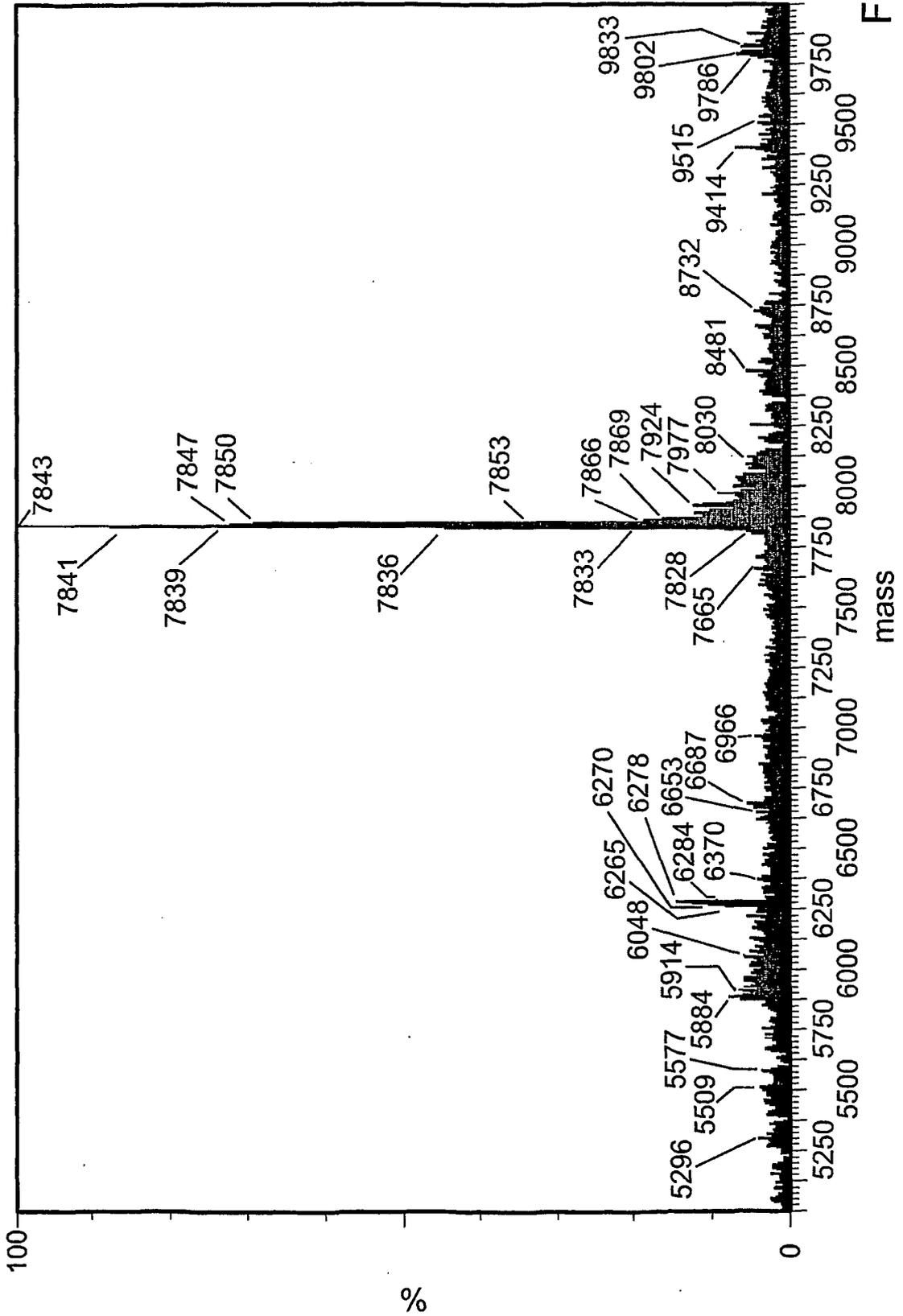


FIG. 4

1: Scan ES+  
2.95e7

1-HPLC-TFA - 5.95%B-30' - 5%B - 60%ACN  
Fernando-21122006 #2 #09 110 (17.346) ME [Ev-286743,It18] (Gs,0.750,500:3930,1.00,L33,R33); Cm (108:111)



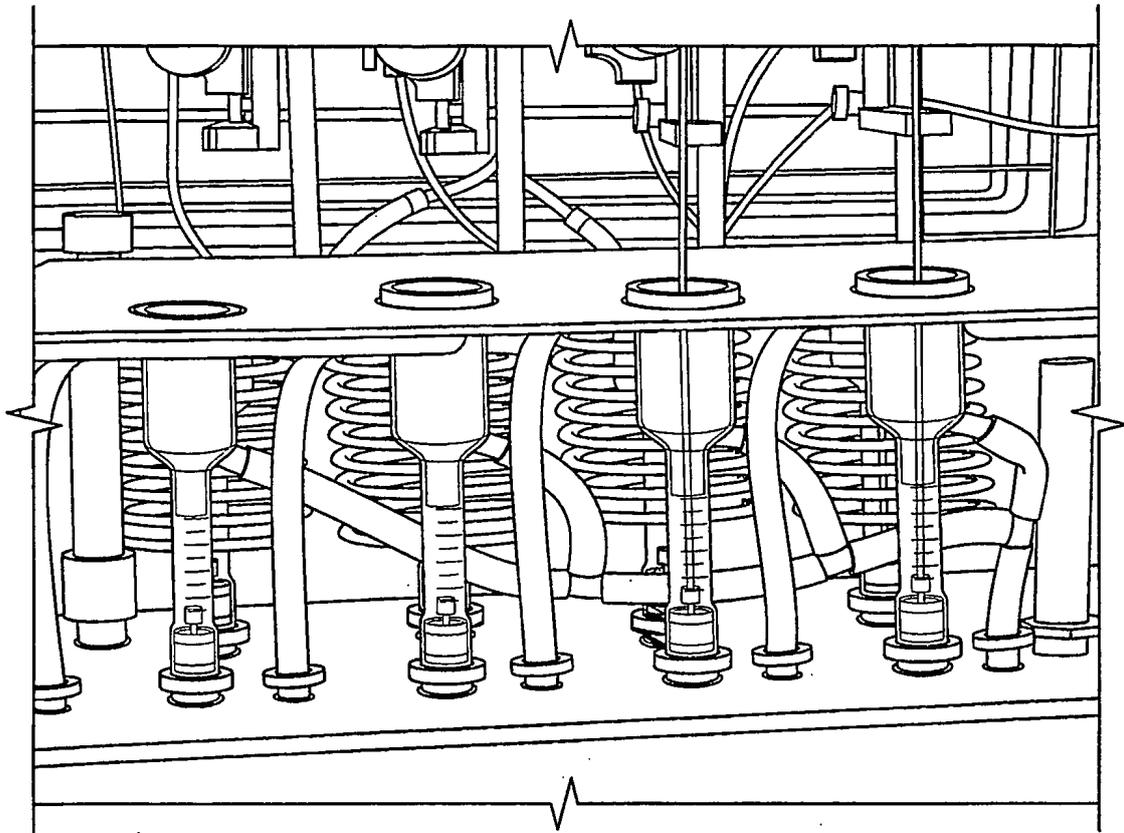


FIG. 6A

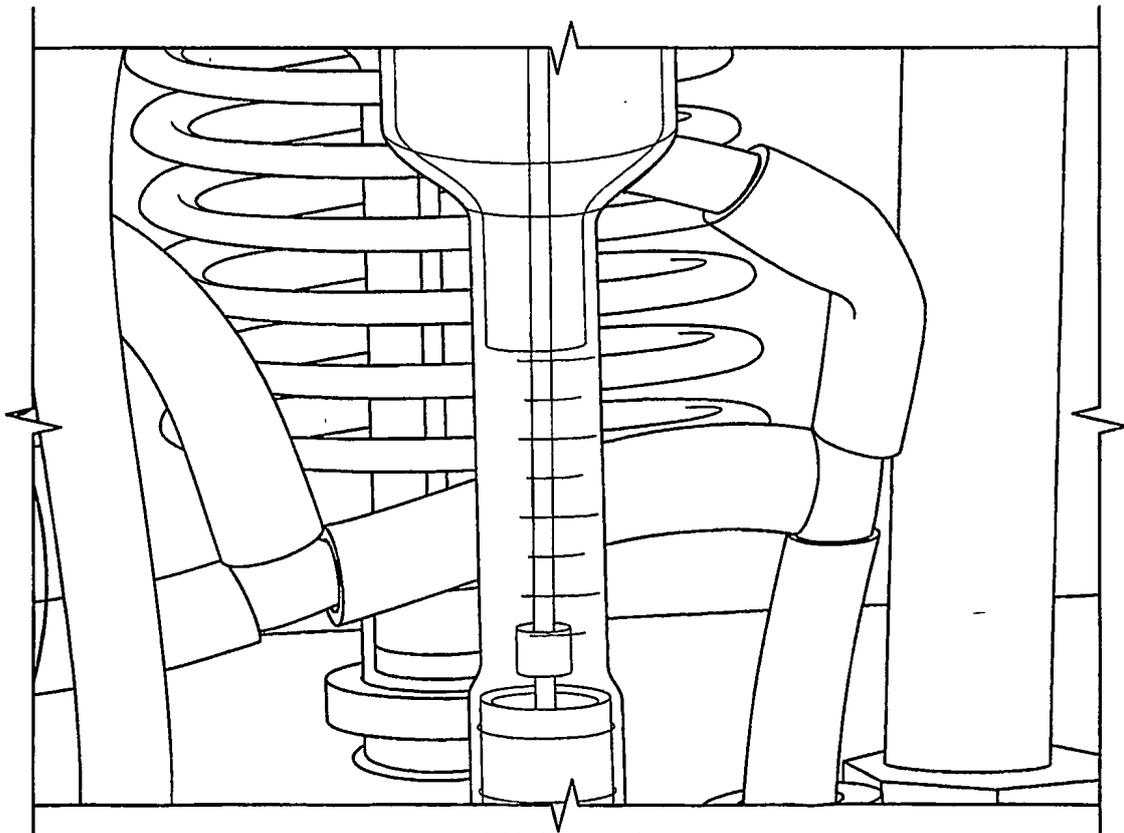


FIG. 6B

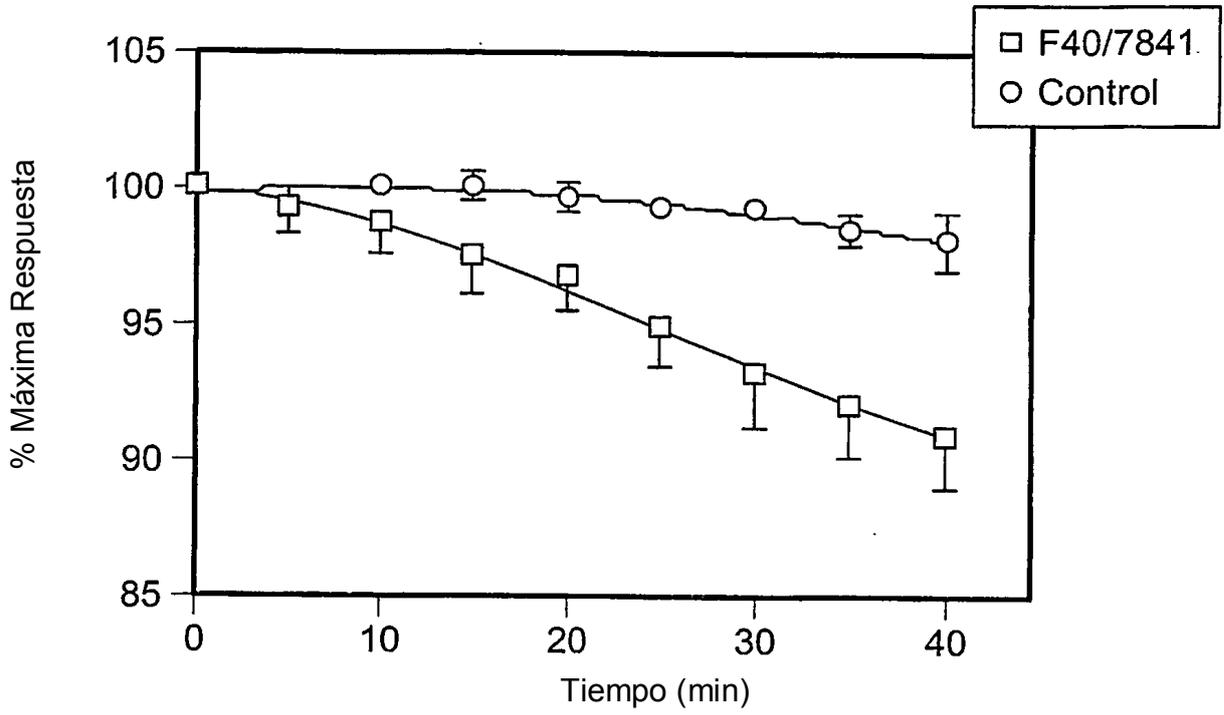


FIG. 7

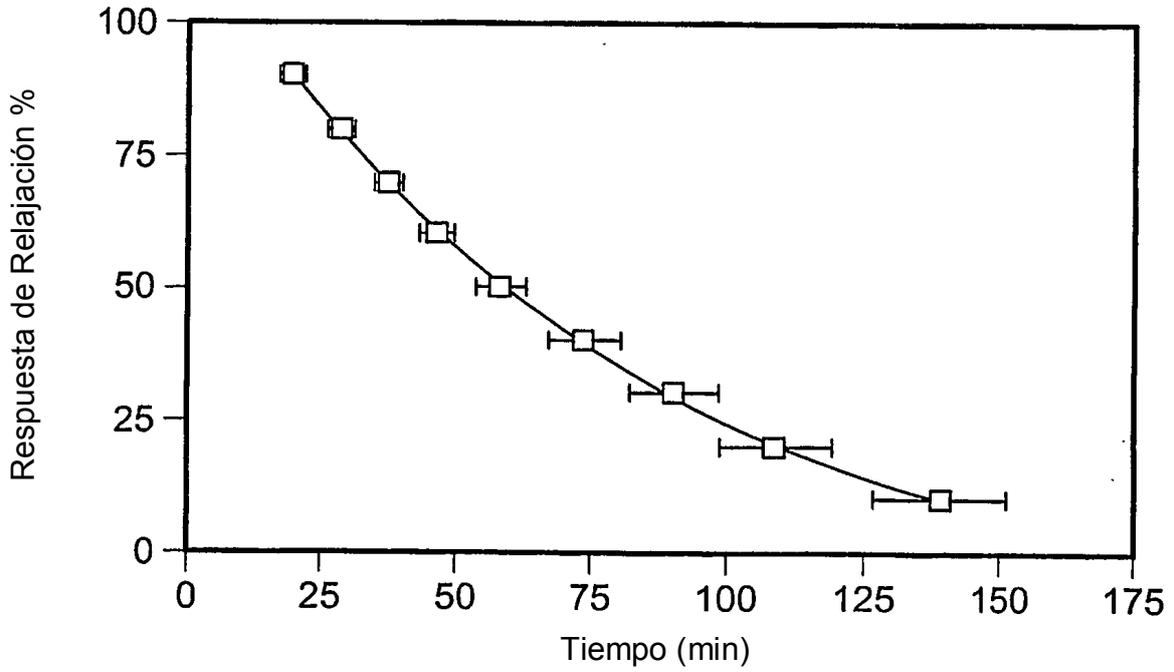
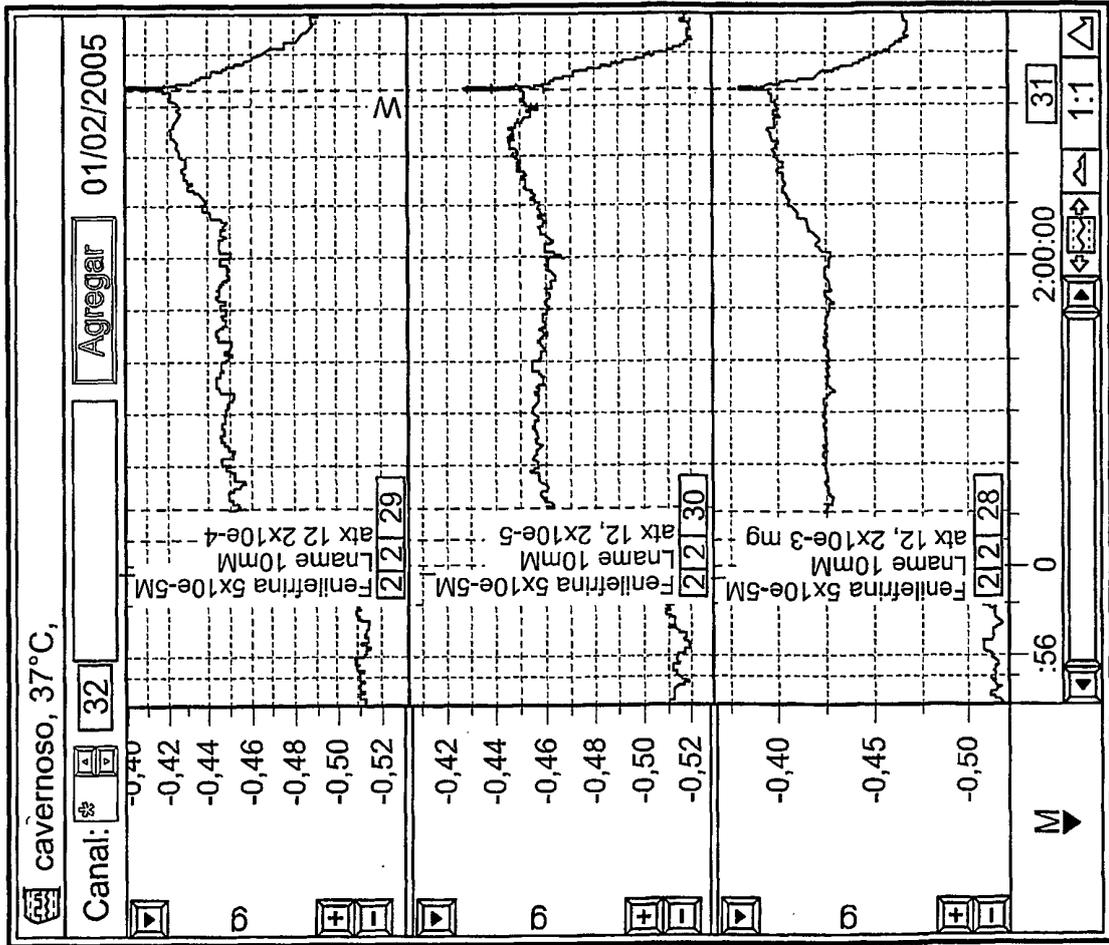


FIG. 8





CH 1: Canal 1

CH 2: Canal 2

CH 3: Canal 3

FIG. 11

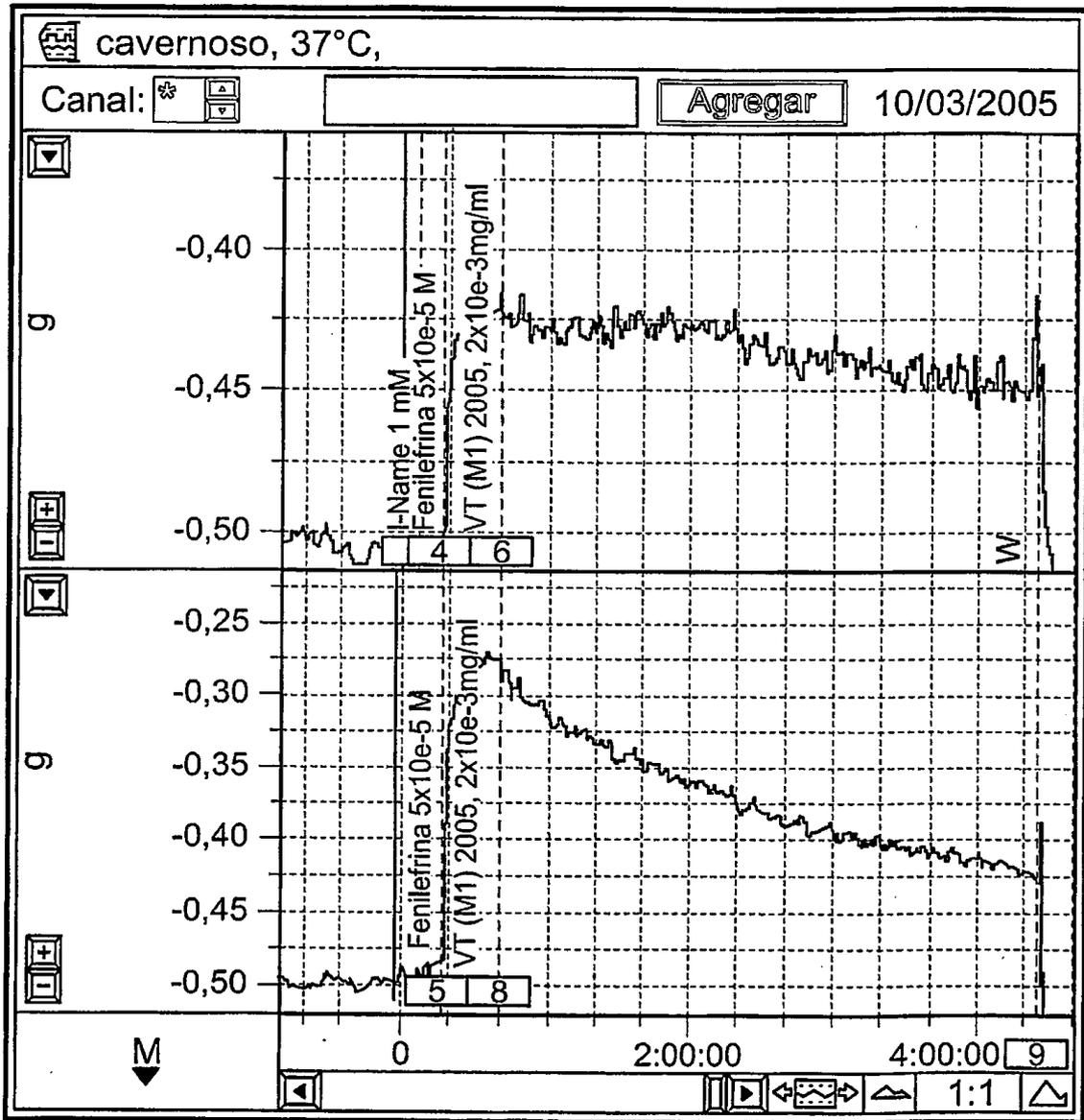
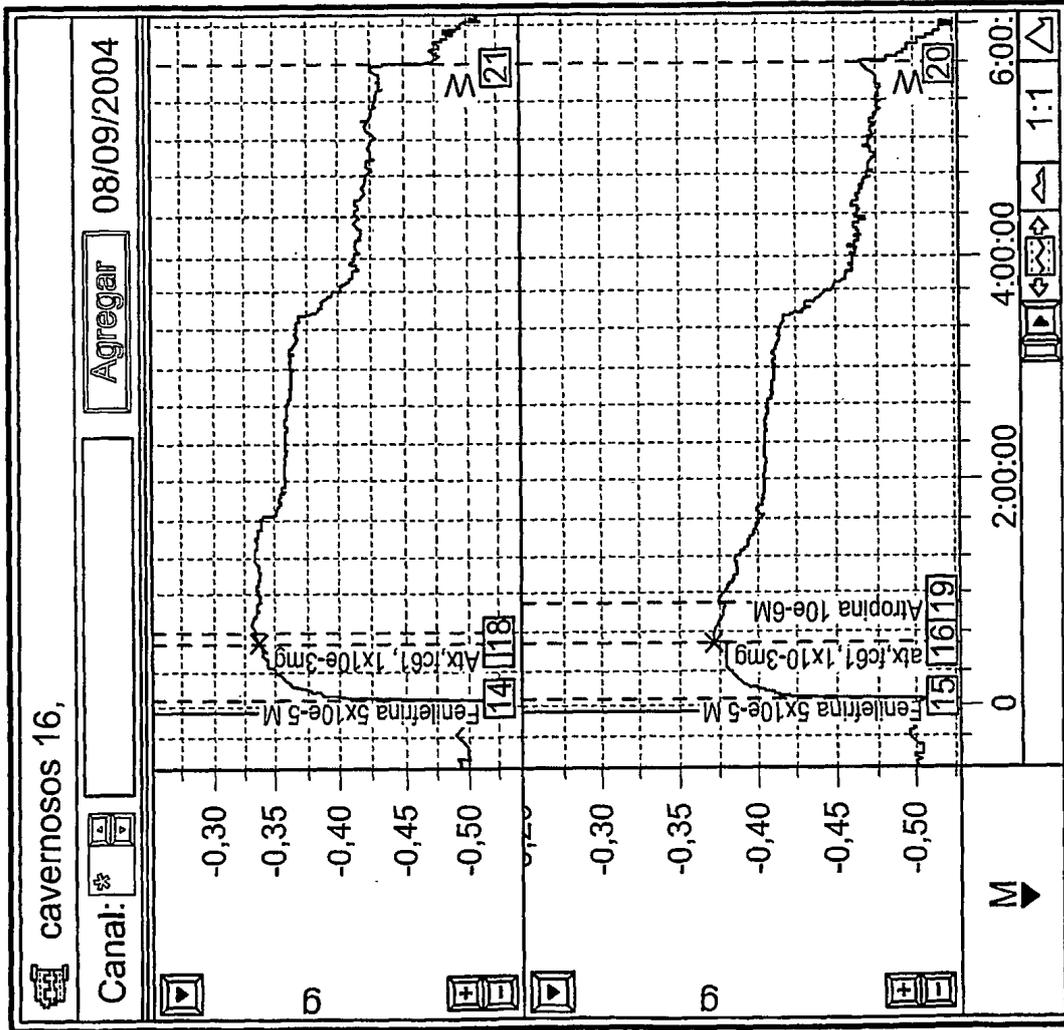


FIG. 12



CH 1: Canal 1

CH 2: Canal 2

FIG. 13

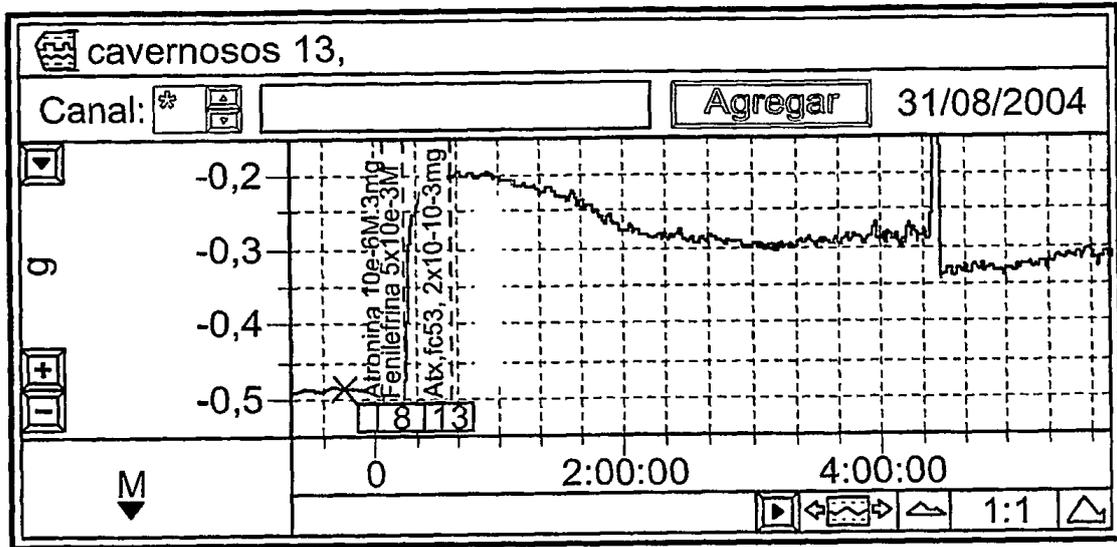


FIG. 14

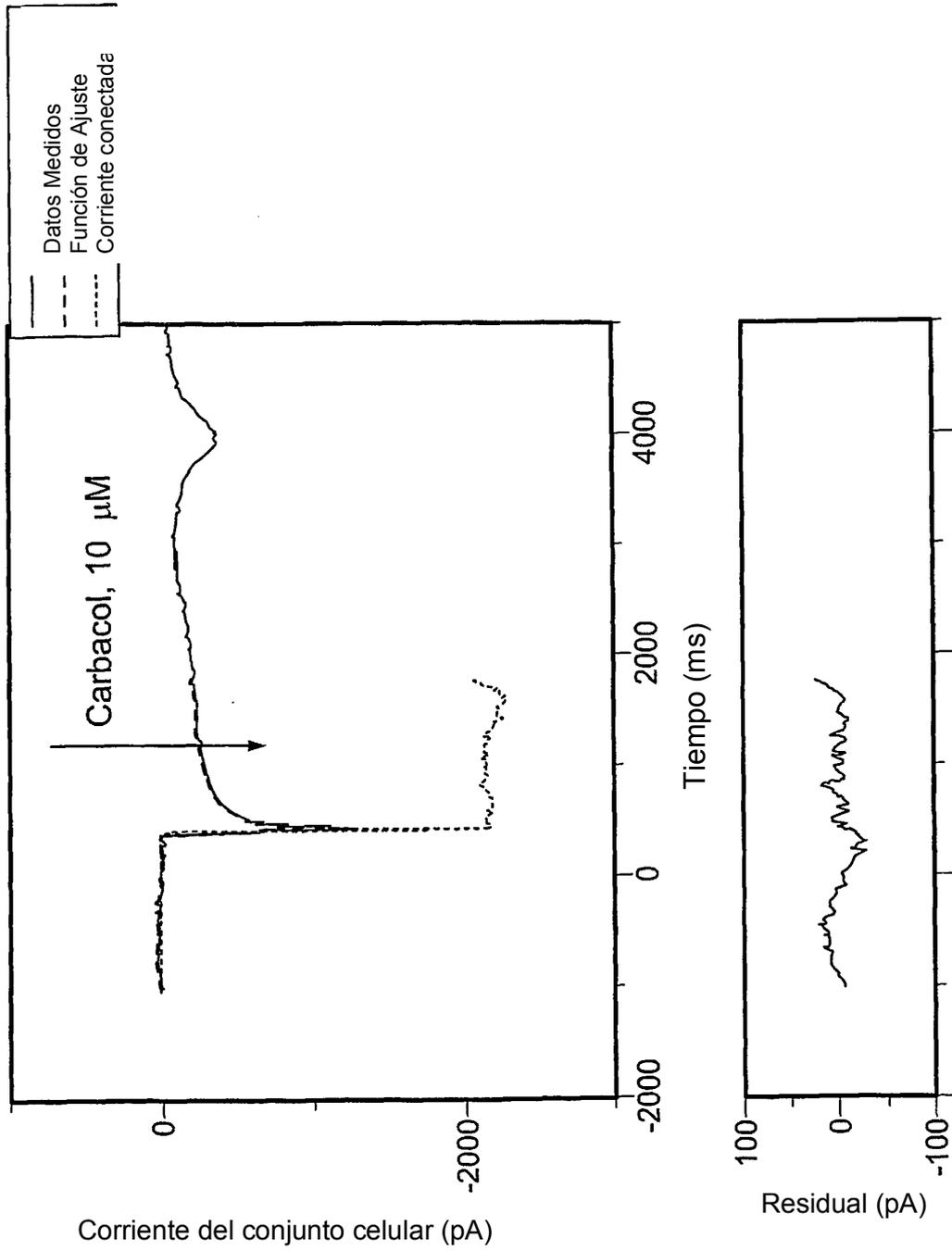


FIG. 15

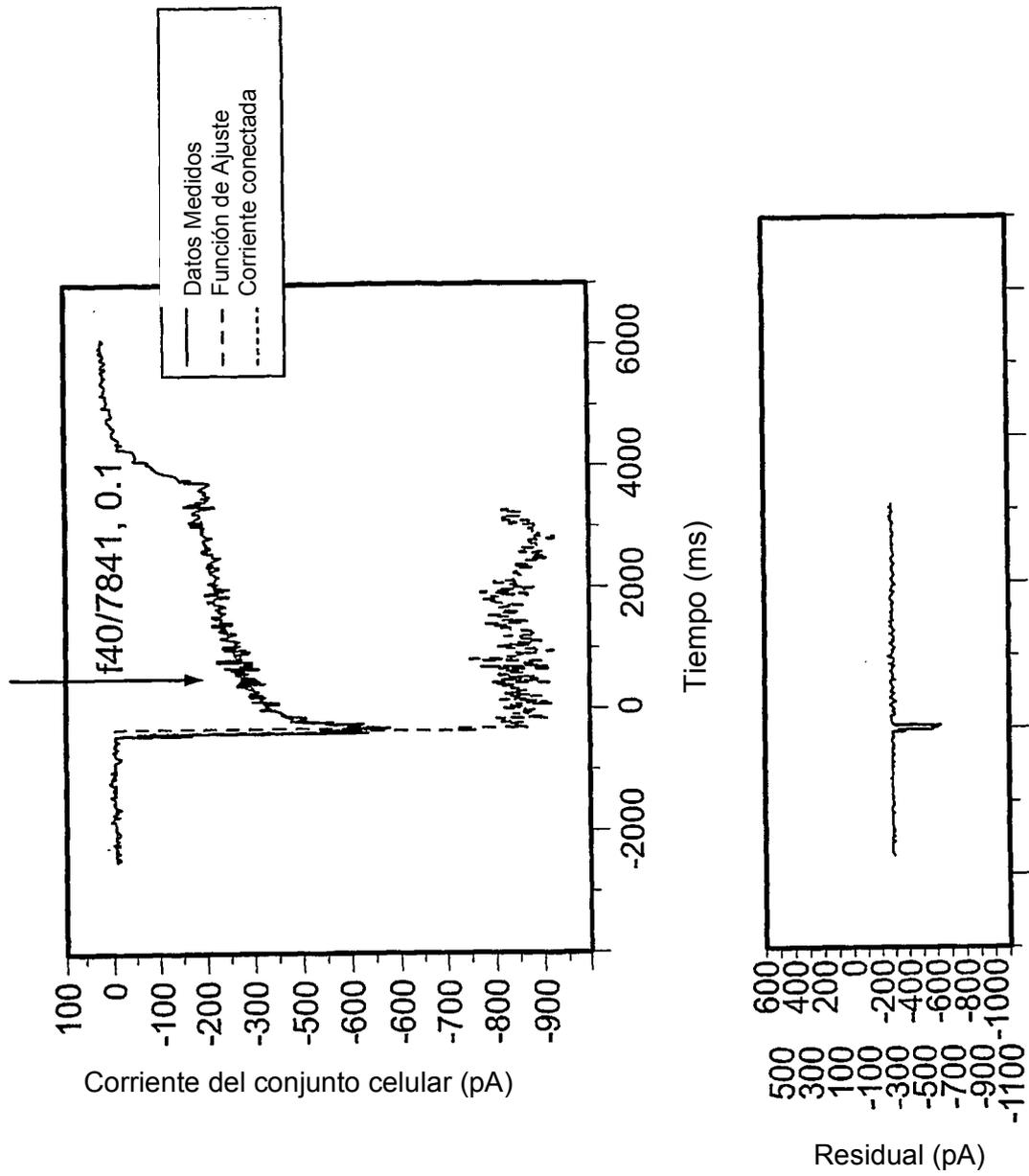


FIG. 16

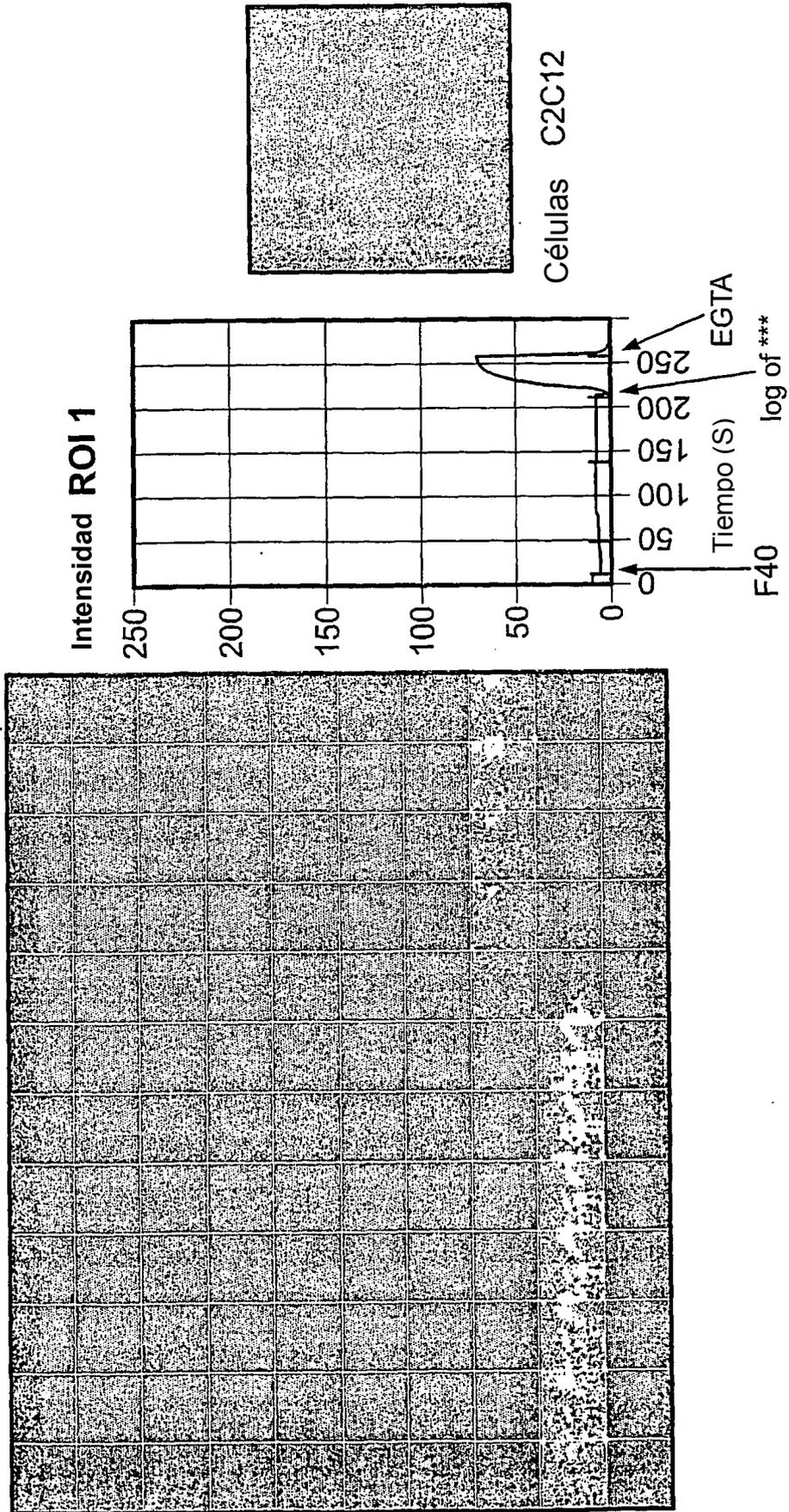


FIG. 17