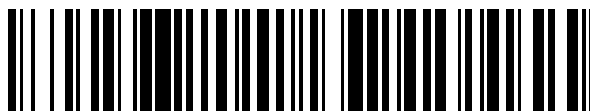


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 713**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 15/16 (2006.01)

A61P 15/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010 E 10848300 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2551280**

54 Título: **Péptidos anticonceptivos derivados de veneno de araña**

30 Prioridad:

23.03.2010 CL 2612010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.02.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA (25.0%)
1145 Avenida Francisco Salazar**

Temuco 4811230, CL;

UNIVERSIDAD DE CHILE (25.0%);

**UNIVERSIDAD FEDERAL DE SAO PAULO (25.0%) y
LABORATORIOS ANDROMACO S.A. (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ROMERO MEJIA, FERNANDO;
SANCHEZ GUTIERREZ, RAÚL;
BUSTOS OBREGON, EDUARDO;
DE MIRANDA, ANTONIO y
RUDOLPHY FONTAINE, ANDRÉS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 529 713 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

Péptidos anticonceptivos derivados de veneno de araña

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a péptidos con actividad anticonceptiva. En particular, los péptidos son obtenidos de fracciones moleculares del veneno de la araña *Latrodectus mirabilis*.

ANTECEDENTES

La anticoncepción o contracepción, consiste en el uso de distintos métodos para evitar la fecundación o embarazo al mantener relaciones sexuales. En la actualidad existen distintos métodos que buscan evitar la fecundación, que pueden clasificarse en métodos de barrera y métodos químicos y hormonales.

- 10 Dentro de los métodos químicos destacan los espermicidas, que son compuestos químicos que matan o desactivan a los espermatozoides.

- 15 Los espermicidas, desde un punto de vista fisiológico, deben afectar la motilidad del espermatozoide, afectar la respuesta capacitiva, alterando el potencial de membrana por bloqueo de corrientes específicas de alguna especie iónica importante para completar la maduración del espermatozoide (como Calcio), bloqueo de receptores de progesterona o de sustancias que actúan como componentes quimiotácticos del espermatozoide.

- 20 Uno de los espermicidas que se ha utilizado en algunos países es el Nonoxinol-9, una molécula bioorgánica que ejerce su acción fundamentalmente como biodetergente de estructuras de membrana. Esto significa que produce digestión parcial de los lípidos constituyentes de barrera de membrana. Así, el biodetergente desarrolla microporos en la membrana, destruyendo la capacidad de barrera que limita los espacios intra y extra celulares, por lo cual se produce el equilibrio termodinámico transmembrana y muerte de la célula afectada. Las formas de presentación farmacéutica del Nonoxinol-9 son como aditivo para métodos anticonceptivos de barrera (condón), usado como lubricante y espermicida; óvulos vaginales conteniendo 168 mg de sustancia; en esponjas anticonceptivas que tienen 1.000 mg de sustancia; en geles lubricantes para uso vaginal y diafragmas vaginales. Los efectos colaterales que esta molécula ha producido le ha significado la no aceptación por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos. Estos efectos indeseados se producen porque el Nonoxinol-9 en presencia de otros tejidos celulares (mucosa vaginal, pared del cuello uterino, membranas de revestimiento de labios mayores y menores en la mujer y en el hombre superficie de epitelio de revestimiento de la zona del glande, epitelio de revestimiento del meato urinario) provoca cuadros de irritación, inflamación y queratosis. Así, al ser aplicado en la zona genital de uno a ambos miembros de la pareja, se aumenta la probabilidad de contagio de Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS), dado que en algunos reportes de la OMS se ha vinculado el uso repetido de Nonoxinol-9 con infecciones del tracto urinario. Como ejemplo, los geles lubricantes han sido diseñados para usarse vaginalmente. Sin embargo, existen personas que los utilizan vía rectal, lo cual dado la presencia de Nonoxinol-9 puede promover disrupción del epitelio rectal. (Phillips DM *et al.* 2000)

- 35 Los espermicidas pueden tener origen natural o sintético. Un ejemplo de espermicida de origen natural es el Gosipol. Desde el año 1950 en China se extrajo el Gosipol que se obtenía de semillas de algodón. Este producto aparece como un potente anticonceptivo para hombres ya que inhibe competitivamente la deshidrogenasa láctica que era importante en la producción de espermatozoides. Fue utilizado en concentraciones de 75 - 100 µg dos veces al mes. El problema asociado con esta estructura molecular fue que producía una esterilización química en los individuos, por lo cual no pudo ser patentado como un espermicida químico, además de producir hipopotasemia, efectos a nivel de sistema digestivo, fatiga y en casos extremos parálisis.

- 40 La publicación de Reddy y colaboradores "Antimicrobial peptides: premises and promises" International Journal of Antimicrobial Agents 24 (2004) 536-547, describe el uso potencial como anticonceptivo de péptidos antimicrobianos que alteran el flujo de iones a través de las membranas en espermatozoides. Menciona como ejemplos de dichos péptidos a magainin-A y nisina. Sin embargo, no se encuentra referencia a péptidos o análogos sintéticos obtenidos desde una fracción del veneno de *Latrodectus mirabilis*.

- 45 Yeung y colaboradores en "Effects of the ion-channel blocker quinine on human sperm volume, kinematics and mucus penetration, and the involvement of potassium channels" Molecular Human Reproduction Vo1.7, No.9 pp. 819-828, 2001, describen los efectos de quinina sobre distintos canales iónicos, en particular las consecuencias que tiene sobre el volumen celular. Se menciona que dichos canales podrían ser el blanco de potenciales anticonceptivos, sin embargo no se presentan ejemplos de aplicación, ni sugerencias sobre otros péptidos que podrían tener una función similar. En particular, no se mencionan extractos del veneno de *Latrodectus mirabilis*.

5 La solicitud de patente EP448464A1 describe un método para determinar si un espermatozoide sufre la reacción acrosomal, usando proteínas C3, C3b o iC3, o sus fragmentos. Se describe que los anticuerpos contra las proteínas o fragmentos mencionados podrían usarse como vacunas anticonceptivas masculinas o femeninas. Aun cuando en este documento se mencionan alternativas de origen peptídico o proteico, la finalidad es la generación de una vacuna anticonceptiva, que difiere de la presente invención relacionada con un espermicida basado en extractos del veneno de *Latrodectus mirabilis* o de un péptido sintético basado en las secuencias nucleotídicas obtenidas del mismo extracto.

10 La patente de Estados Unidos US6897291B1 describe canales iónicos que pueden usarse para identificar potenciales moléculas que podrían servir como anticonceptivos, sin embargo, no describe nuevas moléculas anticonceptivas ni espermicidas, sino que sólo proporciona un método para identificarlas.

La patente Australiana AU772403B2 describe polipéptidos basados en FSP95, una proteína que se localiza en la cola del espermatozoide y tiene una función en la motilidad una vez que el espermio se ha capacitado. Se menciona el uso de dichos polipéptidos con fines anticonceptivos, sin embargo, no existe en dicha publicación información relativa a su efectividad, ya que no se describen datos biológicos.

15 Las solicitudes de patente en Estados Unidos US20040157292-A1, US20090104604-A1, US20060257868-A1, US20090249499-A1, describen distintos canales iónicos (CatSper1, CatSper2, CatSper3, CatSper4, respectivamente). Dichos canales se usan para diagnóstico de infertilidad, y en todos los documentos se menciona el uso de preparaciones que contienen inhibidores de dichos canales como un posible anticonceptivo. En particular se mencionan anticuerpos contra dichos canales iónicos, sin embargo, no se sugiere ni se mencionan péptidos anticonceptivos.

20 La solicitud de patente en Estados Unidos US20070105188A1 describe métodos para identificar potenciales moléculas anticonceptivas, pero no describe tales moléculas.

WO 2009/083808 describe un péptido, cuya secuencia de aminoácidos es 98.55% idéntica respecto a la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 1 y 90% idéntica respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

25 El documento Antonio de la Jara: "Chile's black widow spider may yield spermicide", Reuters Santiago, 1 Julio 2007 (que puede ser descargado de Internet: URL: <http://www.reuters.com/assets/print?aid=USN0132580120070601>) describe una molécula anticonceptiva en el veneno de la viuda negra de Chile *Latrodectus mactans*. Este documento menciona el descubrimiento de una molécula, pero no describe la estructura específica de esta molécula.

30 De esta forma, no existe actualmente en el estado de la técnica una molécula de origen peptídico, orgánico ni inhibidor inmunológico que presente propiedades espermicidas y que sea susceptible de utilizar para la preparación de un producto farmacéutico viable para la inhibición de espermatozoides.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

35 FIGURA 1. Secuencia aminoácida del péptido nativo (Parte superior) y de tres análogos sintéticos contruidos a partir de éste. La tercera fila, denominada Ac-[Ala43]-Atx41-62-NH2 muestra la secuencia del análogo que presenta actividad espermicida, el cual fue utilizado para realizar los ensayos de motilidad espermática y cuya secuencia se presenta también en SEQ ID NO 2.

40 FIGURA 2. Efecto inmovilizante del veneno total (Vt), fracciones (F) y análogo construido, en espermatozoides humanos seleccionados (swim up), incubados por 45 minutos en medio HTF. (Log atx: logaritmo de concentración (en mg/ml) de agente espermicida ensayado). El IC50 para el análogo equivaldría a 39,81 µg/ml. El IC50 para el veneno total equivaldría a 17,8 µg/ml.

45 FIGURA 3. El gráfico muestra el resultado de número de espermatozoides (sp) humanos que se fusionan en la zona pelúcida de un gameto femenino (oocito de hámster). Se utilizó la técnica de Yanagimachi et al (1976) que consiste en un método aislado de test de fertilidad de espermatozoides. Se realizaron 3 repeticiones con 5 ovocitos por grupo cada vez (n= 15 ovocitos por grupo) y se observó que el promedio de espermatozoides que impactan la zona pelúcida de oocitos es de 2,75 en el control (barra vacía) y cuando se interpone en la zona del fluido de los espermatozoides un medio con presencia de veneno total (barra gris) o del análogo (barra negra) el número de espermatozoides adheridos es inferior a 1, para la misma población de oocitos usados. Esto demuestra que hay una disminución del orden del 90±0,1% y de 82±0,3% de la capacidad fecundante de los espermatozoides en presencia de veneno total y de análogo péptidico, respectivamente. La concentración utilizada fue el IC50 calculado previamente en la curva dosis respuesta de motilidad espermática progresiva (FIGURA 2).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para comprender mejor la descripción de la presente invención, se entenderá que un espermatozoide no capacitado es un gameto celular inerte que debe sufrir cambios bioquímicos y electrofisiológicos del proceso de transformación del gameto de célula inerte a una célula funcional, proceso que se conoce como capacitación.

5 La presente invención se relaciona con fracciones moleculares obtenidas del veneno de la araña *Latrodectus mirabilis* (nombre común: viuda negra o araña de poto colorado). Dichas fracciones moleculares han permitido desarrollar una línea de productos de síntesis peptídica con acción biofarmacéutica, que inducen cambios bioquímicos y electrofisiológicos que afectan al espermatozoide maduro y eyaculado al modificar su potencial capacitivo fecundante (evitan que el espermatozoide se capacite). Por tanto, dicha acción biofarmacéutica
10 corresponde a una actividad anticonceptiva, donde se inhibe la respuesta de fecundidad del espermatozoide humano.

El principio activo del anticonceptivo de la presente invención, induce modificaciones bioquímicas sobre los espermatozoides, en relación a cambios de pH intracelular, modificación en niveles de producción de óxido nítrico intracelular, inducción de cambios de concentración de Ca^{2+} intracelular, modificación del potencial mitocondrial y de potencial de membrana, así como de modificaciones en las corrientes iónicas de potasio y calcio intracelular.
15

El espermicida peptídico, que corresponde a una modificación del péptido que se encuentra en una fracción molecular del veneno de *Latrodectus mirabilis*, es un compuesto de bajo peso molecular (2387 Da), de fácil síntesis molecular y que actúa sobre mecanismos de membrana, movilizadores de calcio y potasio que afectan a la propiedad energética y motriz de espermatozoides, inhibiendo su capacidad fecundante.

20 El principio activo es un péptido de 20 aminoácidos que tiene propiedades hidrosolubles y puede cristalizarse por técnicas de liofilización. Las condiciones de uso del principio activo se encuentran en una preparación donde se usa un gel para uso tópico o ligado a un aceite para adicionarlo a preservativos.

En consecuencia, el agente activo de la presente invención, afecta al potencial fecundante sin alterar la integridad de la membrana celular. El principio activo actúa como un agente farmacológico que inhibe la respuesta capacitiva del espermatozoide eyaculado maduro y transformándolo en un gameto no fecundante.
25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a un agente activo con propiedades anticonceptivas. Dicho agente activo corresponde a una fracción molecular del veneno de la araña *Latrodectus mirabilis*.

30 En una realización preferida, el agente activo con propiedad anticonceptiva corresponde a un péptido de entre 10 y 30 aminoácidos, preferentemente 20 aminoácidos. Dicha realización preferida está ejemplificada en la secuencia SEQ ID NO 2, obtenida mediante síntesis química o bien mediante tecnología de ADN recombinante.

La estructura nativa del veneno de *Latrodectus mirabilis* es de alto peso molecular (7843 Da) SEQ ID NO 1, y presenta tres puentes de cisteína (como se muestra en la FIGURA 1, parte superior péptido nativo y parte inferior análogo construido). Dicha estructura vuelve al péptido nativo biotecnológicamente ineficiente para su transformación en un fármaco, debido a los problemas de enrollamiento de la proteína y de la formación correcta de los enlaces disulfuro. Debido a lo anterior, se aisló el fragmento que comprende al principio activo, y a su vez, se reemplazó la cisteína en la posición 43 por alanina y de esta forma se eliminó el puente disulfuro, de manera que se obtiene un péptido "lineal".
35

El análogo construido presenta una estructura cuaternaria y secundaria lineal. La distribución de cargas eléctricas en la superficie de la molécula correspondiente al péptido modificado (SEQ ID NO 2) es tal, que la adhesión a membranas celulares es muy eficiente, llegando en dosis máximas a afectar al 100% de los espermatozoides (FIGURA 2). Las membranas celulares presentan receptores o canales iónicos que son sensibles en su unión a fármacos o drogas en que la molécula principal presenta carga eléctrica (por efecto de la despolarización inducida por la apertura de canales).
40

45 En otra realización preferida también se considera el uso de los agentes activos espermaticidas, para la preparación de una composición usado como lubricante y espermaticida en condones, óvulos vaginales, en esponjas anticonceptivas, en geles lubricantes para uso vaginal y diafragmas vaginales, en gel en forma de película vaginal o presurizada y crema tópica.

La composición que comprende el agente activo, también comprende, entre otros, un componente gel para ser adicionado a preservativos en la cara interna de éste, o bien un gel-sol en forma de óvulo para que se disuelva en el canal vaginal a 37°C.

5 La composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención puede comprender uno o más de los siguientes excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables seleccionados entre: solventes, agentes de dilución, agentes de suspensión, agentes emulsificantes, antioxidantes, conservadores farmacéuticos, agentes colorantes, aromatizantes, vehículos, bases oleosas excipientes tales como: Agua, Glicerina, Propilenglicol, Hidroxietilcelulosa, Diazolidinil Urea, Fosfato Monobásico de Sodio, Trietanolamina, Carcomer, Ácido Poliacrílico, Fosfato Dibásico de Sodio, Propilparabeno, Metilparabeno, entre otros.

10 La lista de excipientes anterior se provee sólo con fines ilustrativos y no pretende limitar el alcance de la invención, donde el principio activo del espermicida corresponde al péptido de la invención, tal como se describe en las reivindicaciones.

EJEMPLOS DE APLICACION

EJEMPLO A: Obtención de principio activo con actividad espermicida a partir del veneno de *Latrodectus mirabilis*

15 Para obtener el veneno debe realizarse la obtención de glándulas de *Latrodectus mirabilis* que contienen su extracto venenoso, con un contenido de 2 a 4 µL por glándula. Para tal efecto, los animales son eliminados mediante un golpe de frío, utilizando hielo seco. Se extraen sus quelíceros que son las estructuras portadoras de las glándulas. Las glándulas son alicuotadas dentro de tubos eppendorf de 2,5 ml, con 200 µL de agua destilada, en medio frío (-4°C). El material biológico obtenido, se procede a guardar en un contenedor hermético, en cámara de frío (-20°C), para ser enviado posteriormente al proceso de fraccionamiento y liofilizado.

20 La purificación del extracto crudo se realizó por cromatografía en Sephadex G-50, del veneno bruto de *Latrodectus mirabilis*, obteniendo un recuperado del 85 %, y cada pool fue rotulado como Aracnotoxina = Atx 1, 2, 3, 4. Posteriormente, fueron recromatografiados en HPLC en columna líquida. Los picos fueron separados y su contenido fue liofilizado. Se determinó como rendimiento, a mg de fracción obtenida / 100 mg de veneno bruto utilizado. En la purificación de los péptidos, se utilizó un sistema de cromatografías preparativas de Waters (modelo Delta Prep. 4000), acoplado a un detector UV-VIS (modelo 486), colector de fracciones LKB-Frac-200 de Pharmacia, registrador Servogor 120.

Las condiciones experimentales fueron:

- Columna: Vydac C18 (10 x 250 mm), 300 Å, 150 µm
- 30 • Solventes : A: 0,1% TFA/H₂O
B: 0,1% TFA - 60% ACN/H₂O
- Gradiente: 1-61%B en 60 minutos
- Flujo : 10 mL/min
- Onda : 220 nm

35 Con la fracción identificada como F50, obtenida por perfil cromatográfico, se contó con un fragmento de 7850 Da, el que fue purificado y secuenciado, dando lugar a una secuencia de 69 aminoácidos (SEQ ID NO 1). Esta cadena de 69 aminoácidos fue analizada por método de BLAST y se encontró que presenta alta analogía, de sitios conservados de la cadena terminal, presentes en la α - latrotoxina obtenida de la araña *Latrodectus tredecimguttatus*. Con el fragmento terminal de 20 aminoácidos, de Ser41 a Lys52 (porción altamente conservada), se construyó un análogo peptídico reemplazando la cisteína en la posición 43 por alanina y de esta forma se eliminó el puente disulfuro, de manera que se obtuvo un péptido "lineal".

40 Los péptidos usados en este trabajo se sintetizaron manualmente mediante síntesis en fase sólida. Para este método, las estrategias t-Boc y Fmoc usaron las resinas MBAR, BAR y Rink como soporte sólido. Los acoplamientos fueron realizados, con 2,5 de exceso de Boc-aa y de DIC/HOBt en DCM/DMF (1:1; v/v) durante 1 hora y monitoreados por el test de Kaiser. El reacoplamiento, cuando fue necesario, fue realizado usando 2,5 de exceso de Boc-aa y TBTU y/o BOP con exceso de DIEA (pH entre 8,0-9,0) en DMSO/NMP (1:4; v/v) por 1 hora. Cuando fue necesario, durante la síntesis en general, fueron realizados tres reacoplamientos seguidos con un test de ninidrina

positivo. En el que, finalmente la peptidil-resina fue sometida a una reacción de acetilo con anhídrido acético en DMF (1:4; v/v), durante 20 minutos.

EJEMPLO B: Determinación del efecto espermicida del péptido nativo SEQ ID NO 1 en espermatozoides humanos.

El efecto espermicida del péptido nativo y del análogo construido fue ensayado mediante evaluación de motilidad espermática en espermatozoides humanos. Para esto, se colocó en un tubo, 15 mL de medio HTF-BSA 0,1% (0,02 g BSA en 20 mL HTF) y 3 mL de medio HTF-BSA 1% (0,04 g BSA en 4 mL HTF) y se estabilizó en estufa a 37° C. La muestra de semen humano a continuación fue dejada en estufa por 25 minutos para que licúe (se trabajó con 2,6 mL de semen total). Una vez licuada la muestra fue dividida en 3 tubos cónicos de 15 mL con 2 mL de HTF-BSA 0,1% tibio en cada tubo. Se agregó 860 µL de semen licuado por tubo, hasta el fondo en forma vertical y pipeteando suavemente para homogenizar, evitando burbujas. Se eliminaron coágulos grandes. A continuación, se centrifugó la muestra durante 8 min a 1.800 rpm descartando el sobrenadante, tocando las paredes del tubo y tocando con la punta de la pipeta el medio. El pellet obtenido fue resuspendido en 3 mL de HTF-BSA 0,1% para disgregar, y luego centrifugado por 10 minutos a 1.800 rpm, eliminando el sobrenadante. El pellet obtenido fue nuevamente resuspendido en 1 mL de HTF-BSA 1% tibio con el tubo vertical, agregando el medio suavemente. A continuación se incubó la preparación por 1 hora a 37° C con el tubo inclinado en 45° (swim up). Una vez completada esta etapa, se sacó la nube de espermatozoides y se juntaron los sobrenadantes para luego centrifugar por 8 minutos a 1800 rpm, descartando el sobrenadante. Luego, se realizó recuento de los espermatozoides obteniéndose un valor de 10 millones de espermatozoides seleccionados por mL (10×10^6 /mL). Se aplicaron distintas concentraciones de veneno total y de las distintas fracciones del veneno obtenidas por cromatografía, así como del análogo construido a muestras de los espermatozoides ya seleccionados y contados y se incubó en medio HTF a 37°C por 45 min. Se extrajo una gota de la muestra y se colocó sobre un portaobjetos temperado a 36-37°C y se colocó sobre ésta un cubreobjetos, también a la misma temperatura. Se observó al microscopio, siempre sobre la platina térmica, a 400 aumentos. Se observó un campo y se valoró subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que giran en círculo o avanzan en forma oscilatoria, se consideran que tienen movimientos anormales. El porcentaje que se indicó (FIGURA 2) es el de los espermatozoides sin movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides aceptados, siendo el valor mínimo aceptable del 50 %, versus el logaritmo de la concentración de agente espermicida utilizado (log ATX: veneno total, análogo construido o fracciones cromatográficas de veneno; F47, F48, F50).

EJEMPLO C: Síntesis química del péptido activo

Los péptidos fueron sintetizados mediante síntesis química tipo t-boc la cual consiste en desarrollar un protector temporal de los N-α-aminogrupos o grupo acil.labil-terc-butiloxicarbonila y para las cadenas laterales son utilizados protectores derivados del grupo bencilo (Bzl) que son resistentes a los ácidos débiles (Ácido trifluoracético; TFA) y son removidos por ácidos fuertes tales como el fluoreto de hidrógeno (HF). En la estrategia del t-boc, la desprotección de los N-α-aminogrupos es realizada con un gradiente del 30%-50% TFA en diclorometano (DCM) y la neutralización es con 5% TEA (Tetraetilamonio) en DCM (diclorometano) al 10% de DIPEA (N,N trazodiisopropiletilamina) en DCM. La desprotección de los N-α-aminogrupos fue hecha con TFA 50% en DCM y la neutralización con 10% TEA. Fueron utilizados en la etapa de acoplamiento de los aminoácidos los siguientes reactivos: BOP (Benzotriazol-1-iloxi(trisdimetilamonio)fosfoniumhexafluorofosfato) en presencia de DIPEA y TBTU (N,N,N',N'-tetrametil-o-(benzotriazol-1-il)uronium) en presencia de DIPEA. En todos ellos fueron utilizados 2,5 equivalentes de exceso y el tiempo de reacción varió de 1 a 2 hrs. El sistema de solventes utilizado en presencia de DIC/HOBt fue una mezcla de 50% de DCM en DMF (dimetilformamida), en tanto que para el BOP/DIPEA o TBTU/DIPEA se utilizó 20% de DMSO en NMP (N-metil-pirrolidona). En el caso de fallar la tercera alternativa de acoplamiento, el aminoácido incorporado es acetilado. La acetilación significa una reacción con 20% de anhídrido acético en DMF más 3 gotas de Pyr por 20 min.

Durante toda la reacción se utilizó el test de Kaiser para monitorear el acoplamiento y desprotección de los aminoácidos correspondientes.

Para la liberación del péptido desde la resina se procedió a retirar los protectores de cada aminoácido con tratamiento de HF anhidro en una concentración de 10 ml/gr. de peptidil resina, utilizando 10% de anisol, dimetil sulfato y tioanisol. Se utilizan reservorios de vacío y frascos de teflón. La reacción ocurre a 0°C sobre agitación constante por dos horas debido a gran cantidad de residuos de arginina y se procede de igual forma para el protector lateral TOS que es parcialmente resistente a la remoción por HF. Después del término de la reacción, el HF es eliminado por vacío siendo neutralizado por una solución de 80 mg de carbonato de sodio en 800 ml de agua desionizada. El péptido fue lavado en éter (g) con lo que la resina se precipita y el péptido bruto es extraído con una solución de ácido acético 5% y 50% en agua.

A continuación los péptidos fueron ciclados para formar enlaces disulfuros. El material que se utiliza es un balón de 3 bocas de 3 L. de capacidad. El péptido bruto se disuelve en 400 ml de agua desionizada utilizando un agitador magnético, una bomba de oxígeno y un pH metro. La solución es aireada por 72 hrs en una cámara fría entre 8°-10°C a pH constante 7,0. La eficacia de la ciclación es seguida por evaluación RP-HPLC.

5 Finalmente el péptido fue liofilizado, purificado y caracterizado mediante HPLC.

EJEMPLO D: Producción de peptido espermaticida (Ac-[Ala43]-Atx41-62-NH₂) por tecnología de ADN recombinante.

10 El péptido espermaticida Ac-[Ala43]-Atx41-62-NH₂ (PM 2387,72 Da) posee una secuencia conocida de aminoácidos (SEQ ID NO 2) que permite determinar la secuencia de ADN que codifica dicho péptido (SEQ ID NO 4). La secuencia es posible de fabricar por métodos convencionales de síntesis de oligos de ADN y a la cual se le adicionan los sitios de restricción respectivos del vector plasmidial que serán utilizados para el subclonamiento. Como ejemplo, los vectores plasmidiales pF25 A y F permiten expresar el péptido en extractos de línea celular de insecto Sf21 o en bacterias BL21 codon plus de la empresa PROMEGA Corp. USA.

15 El péptido obtenido puede ser purificado por el método convencional de HPLC que permite el aislamiento de este y la obtención de las cantidades requeridas según la demanda del producto.

EJEMPLO E: Producción de péptido nativo por tecnología de ADN recombinante.

20 El péptido nativo (PM 7843,70 Da) posee una secuencia conocida de aminoácidos (SEQ ID NO 1) que permite determinar la secuencia de ADN que codifica dicho péptido (SEQ ID NO 3). La secuencia es posible de fabricar por métodos convencionales de síntesis de oligos de ADN y a la cual se le adicionan los sitios de restricción respectivos del vector plasmidial que serán utilizados para el subclonamiento. Como ejemplo, los vectores plasmidiales pF25 A y F permiten expresar el péptido en extractos de línea celular de insecto Sf21 o en bacterias BL21 codon plus de la empresa PROMEGA Corp. USA.

El péptido obtenido puede ser purificado por el método convencional de HPLC que permite el aislamiento de este y la obtención de las cantidades requeridas según la demanda del producto.

25 **EJEMPLO F:** Disminución de la capacidad fecundante de espermatozoides en presencia de veneno total de *Latrodectus mirabilis* y de análogo construido.

30 La disminución de la capacidad fecundante de espermatozoides humanos fue ensayada mediante ensayos de penetración en oocitos de hámster según el protocolo descrito inicialmente por Yanagimachi *et al* (1976). En breve, se colectaron oocitos de hámster dorado y se removió su zona pelúcida, para luego incubarlos con espermatozoides humanos previamente capacitados en una concentración de 10⁷ espermatozoides/ml. La incubación se prolongó por 3-6 hrs. Posteriormente los oocitos fueron lavados para remover espermatozoides que no penetraron y luego fijados y teñidos con orceína. Los oocitos fueron observados mediante microscopía de contraste de fase y sólo fueron considerados como penetrados por espermatozoides cuando contenían una cabeza en descondesación o un pronúcleo masculino al interior de su citoplasma.

35 **EJEMPLO G:** Composición farmacéutica para aplicación tópica del espermicida de la invención.

Ingrediente	% en peso
Péptido de acuerdo a SEQ ID NO 2	0,00365
Ácido benzoico	0,8
Propilparabenceno	0,02
Ácido sórbico	0,05
Clorocresol	0,075
Vaselina	99,05

ES 2 529 713 T3

SEQ ID NO 1:

ZDSLDPAEFACADDIDQAECLKNNDICLQCEDLHKEGLVFSCLKTNCFSTEYFQHCVKDLEEAKKEPPE

SEQ ID NO 2:

SLAKTNCFSTEYFQHCVKDL

5 SEQ ID NO 3:

taagatagcctggatccggcgggaatttgcgtgcgcggatgatattgatcaggcgggaactg
ctgaaaaacaacgatatttgcctgcagtgcgaagatctgcataaagaaggcctggtgttt
agcctgtgcaaaaccaactgctttaccaccgaatattttcagcattgcgtgaaagatctg
gaagaagcgaaaaaagaaccgcgcgaa

SEQ ID NO 4:

agcctggcgaaaaaccaactgctttaccaccgaatattttcagcattgcgtgaaagatctg

REIVINDICACIONES

1. Un péptido anticonceptivo, caracterizado por que dicho péptido está identificado por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2.
- 5 2. Una secuencia nucleotídica que codifica el péptido anticonceptivo de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que dicha secuencia es SEQ ID NO 4.
3. Método para obtener el péptido anticonceptivo de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que dicho método comprende clonar la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 en un microorganismo.
4. Método para obtener el péptido anticonceptivo de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que el método comprende obtener el péptido por síntesis química del tipo t-boc.
- 10 5. Una composición farmacéutica anticonceptiva, caracterizada por que dicha composición comprende el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 y uno ó más vehículos farmacéuticamente aceptables.
6. Una composición farmacéutica anticonceptiva de acuerdo a la reivindicación 5, caracterizada por que dichos vehículos farmacéuticos están seleccionados del grupo que consiste en solventes, agentes de dilución, agentes de suspensión, agentes emulsificantes, antioxidantes, conservadores farmacéuticos, agentes colorantes, aromatizantes, vehículos, bases oleosas, excipientes tales como: Agua, Glicerina, Propilenglicol, Hidroxietilcelulosa, Diazolidinil Urea, Fosfato Monobásico de Sodio, Trietanolamina, Carcomer, Ácido Poliacrílico, Fosfato Dibásico de Sodio, Propilparabeno y Metilparabeno.
- 15 7. El péptido anticonceptivo de acuerdo a la reivindicación 1, para uso como agente anticonceptivo.
8. El péptido anticonceptivo de acuerdo a la reivindicación 1, para uso como espermicida.
- 20 9. La composición farmacéutica anticonceptiva de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, para uso como agente anticonceptivo.
10. La composición farmacéutica anticonceptiva de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, para uso como espermicida.

FIGURA 1

ATX ₁₋₆₉	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	69
	ZDSLDPAEFACADDIDQAEALLKNNDICLQCEDLHKEGLVFSICKTNCFSTEYFQHCVKDL EEAKKEPPE														
	PM = 7843,7009														
[Cys (Acm) ¹¹] -ATX ₁₋₂₄ -NH ₂	ZDSLDPAEFAC (Acm) ADDIDQAEALLKNN-NH₂														
	PM = 2687,8584														
Ac-[Cys (Acm) ¹¹] -ATX ₂₅₋₅₈ -NH ₂	Ac-DICLQCEDLHKEGLVFSICKTNC (Acm) FSTEYFQHCVK-NH₂														
	PM = 4089,7124														
Ac-[Ala ⁴³] -ATX ₄₁₋₆₉ -NH ₂	Ac-SLAKTNCFTTEYFQHCVKDL-NH₂														
	PM = 2387,7232														

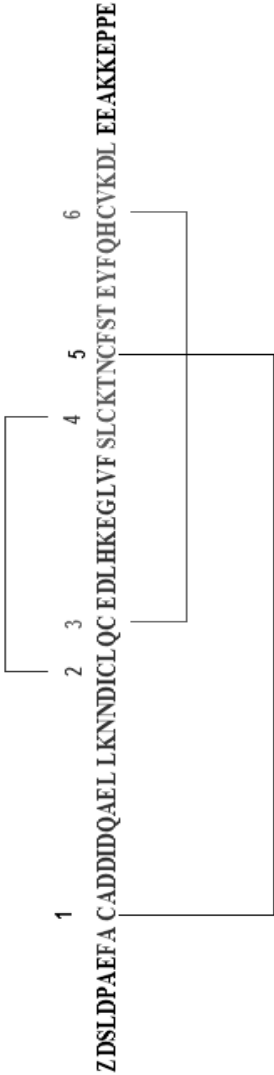


FIGURA 2

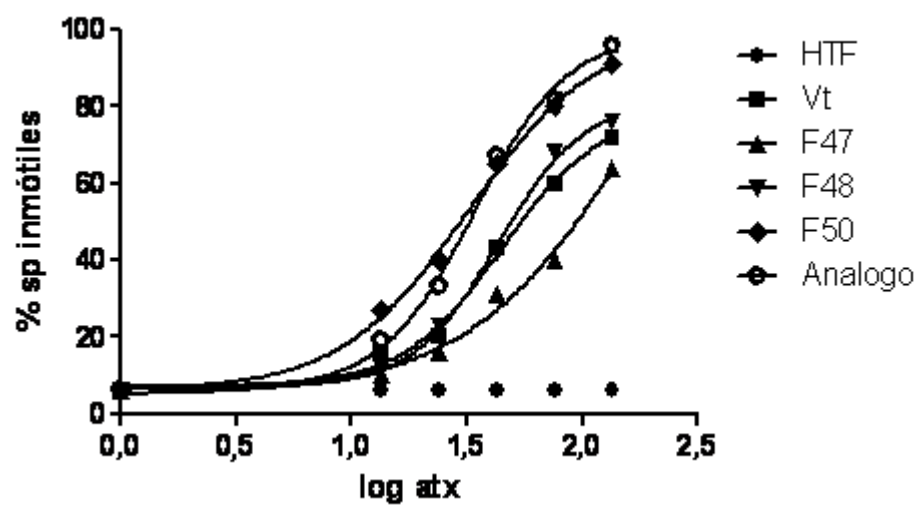


FIGURA 3

