(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 677 149**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013** **PCT/BR2013/000319**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014** **WO14028997**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013** **E 13831141 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 2899198**

(54) Título: **Péptido PnTx(19) sintético, composiciones farmacéuticas y uso**

(30) Prioridad:

20.08.2012 BR 102012028008
13.08.2013 BR 102013025745

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG (100.0%)
Avenida Antônio Carlos 6627 Reitoria 7° Andar Sala 7005 Campus UFMG - Pampulha
31270-901 Belo Horizonte - MG, BR

(72) Inventor/es:

DE LIMA PEREZ GARCIA, MARIA ELENA;
NUNES DA SILVA, CAROLINA;
DE MARCO ALMEIDA, FLÁVIA;
DA SILVA LOMEO, ROSANGELA;
LACERDA BEIRÃO, PAULO SÉRGIO;
SILVA TORRES, FERNANDA y
MONTEIRO DE CASTRO PIMENTA, ADRIANO

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 677 149 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

Péptido PnTx(19) sintético, composiciones farmacéuticas y uso

La presente invención se relaciona con un polipéptido sintético de 19 aminoácidos, denominado PnTx(19), constituido por la secuencia de la toxina nativa PnTx2-6 de la araña Phoneutria nigriventer. También se relaciona con composiciones farmacéuticas que contienen dicho péptido y a su uso en el tratamiento de la disfunción eréctil y/o en la potenciación de la función eréctil.

El veneno de la araña Phoneutria nigriventer, conocida popularmente como "aranha-armadeira" ("araña armada") es rica en polipéptidos bioactivos con diferentes efectos farmacológicos, que actúan principalmente en canales y receptores iónicos. Los síntomas predominantes causados por su veneno son el resultado de la hiperexcitabilidad general. Los estudios han demostrado que la toxicidad del veneno proviene en gran medida de los efectos de la fracción PhTx2 (para una revisión ver: BROGES, MH et. Al. In: Animal Toxin: State of the Art. Perspectives in Health and Biotecnology. Maria Elena de Lima, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Marie Francia Martin-Eauclaire, Russolina Benedeta Zingali y Herve Rochat (organizadores), Belo Horizonte-MG. Editora UFMG. 800p. 2009, GOMEZ, MV y otros, Cellular and Molecular Neurobiology, 22: 5/6, 2002). La toxina PnTx2-6 (MM 5.291.3 Da), publicada a partir de esta fracción, reproduce los efectos sintomáticos de la fracción total después de la inyección intracerebral en ratones (LE SUEUR, L.P. et al. Acta Neuropathol. 105, 125-134, 2003). Su acción puede atribuirse a la demora en la corriente de inactivación de los canales de sodio, teniendo también efecto sobre la activación, en algunos subtipos de estos canales, desplazando la activación a potenciales más negativos (MATATEL, A. et al., Biochemistry. 48 (14), 3078-3088, 2009; CASSOLI et al., com. pessoal 2012).

El efecto de PnTx2 sobre la función eréctil de las ratas se describió anteriormente en la solicitud de patente PI0800596, titulada "Método para a potencialização da função erétil atraveés do uso das composições farmacéuticas de toxina Tx2-6 da aranha Phoneutria nigriventer" (Un método para potenciar la función eréctil mediante el uso de las composiciones farmacéuticas de PnTx2-6 de la araña Phoneutria nigriventer), potencia la erección en ratas normotensas, restaura la función eréctil en animales hipertensos (DOCA-sal), y también en ratones diabéticos o ratas de edad avanzada. (para revisión, ver: NUNES, K.P et al. The Journal of Urology, 9 (10):2574-81, 2012). Estos efectos merecen ser mediados por la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y la liberación de ácido nítrico (NO) (YONAMINE, C.M. et al. Toxicon 44, 169-172, 2004; NUNES et al., 2008, 2009) Además, se sugiere que algunos genes implicados en la vía del ácido nítrico tienen su expresión. Se mejoró el tejido eréctil de los ratones después del tratamiento con la toxina PnTx2-6 (VILLANOVA, F.E., et al. Toxicon 54(6), 793-801, 2009).

El óxido nítrico (NO), un producto de la hidrólisis de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS), es un mediador esencial del proceso de erección [LEWIS, R.W. et al. A. Definitions, classification, and epidemiology of sexual dysfunction. In: Sexual Medicine. Sexual Disfuntion in Men and Women, Lue, T. F.; Basson, R.; Rosen, R.; Giuliano, F.; Khoury, S.; Montorsi, F., (Editores.) International for Sexual Medicine, Paris, p. 39-72, 2004]. Después de su liberación por los nervios no adrenérgicos no colinérgicos (NANC), nervios nitrérgicos y células endoteliales, el NO se propaga a la vecindad trabecular y vascular del músculo liso del pene para estimular la actividad del guanilato ciclasa soluble (GCs), aumentando la concentración de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (TODA, No. et. Pharmacol. Ther. 106 (2), 233-266, 2005; PRIETO, D. Int. J. Impot. Res (20(1), 17-29, 2008). La formación de GMPc induce la disminución de los niveles de calcio intracelular, lo que conduce a la relajación de las células del músculo liso con una tumescencia posterior del pene (TOTA et al., 2005). La erección termina debido a la hidrólisis del GMPc por la enzima fosfodisesterasa tipo 5 ((IGNARRO, L.J. et al. Biochem Biophys Res Commun., 170, 843-50, 1990; RAJFER, J. et al. N. Engl. J. Med. 326(2), 90-94, 1992; LEE, M.R. J. Biol. Chem. 272, 5063-5068, 1997; BIVALACQUA, T.J.et al. Trends Pharmacol. Sci., 21 (12), 484-489, 2000).

En la actualidad, la principal farmacoterapia utilizada para la disfunción eréctil es inhibidores de PDE-5 tales como sildenafil (Viagra), taladafil (Cialis® y vardenafil (Levitra®) (MORELAND, R.B et al. Trends Endocrinol. Metab. 10(3), 97-104, 1999; PRIVIERO, F.B. et al Acta Pharmacol. Sin. 28(6), 751-755, 2007; LEITE, R. at al. Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov. 2(2), 119-132, 2007).

Sin embargo, los inhibidores de PDE-5 no son eficaces en el tratamiento de pacientes con enfermedades vasculares, donde la producción de NO se ve afectada. Por lo tanto, dado que el efecto relajante del músculo liso del cuerpo cavernoso inducido por PnTx2-6 es independiente de la inhibición de la enzima PDE-5, esta toxina permite la producción de medicamentos efectivos para pacientes con disfunción eréctil que no pueden ser tratados por los medicamentos actualmente disponibles.

Otro efecto importante de PnTx2-6 se refiere a la estimulación de la liberación de glutamato de sinaptosoma cerebrocortical de rata [SILVA, 2012-com. Pessoal -SILVA, C.N. Análise da liberação de L-glutamato de sinaptosomas de cortex cerebral de rato pela toxina PnTx2-6 da peçonha da aranha armadeira (Phoneutria nigriventer) (Análisis de la liberación de L-glutamato de la corteza cerebral de ratas por la toxina PnTx2-6 del veneno de la araña armada (Phoneutria nigriventer). Evaluación inicial de la actividad del péptido sintético (PnTx-19) en la liberación de glutamato y como potenciador de la función eréctil. Tesis de maestría que se presentará en agosto 31, 2012, en el Biochemistry and Immunology of the Unviersidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 120 p., 2012]]. Yonamine et al. (2005) encontraron que el PnTx2-6 yodado puede penetrar la barrera

hematoencefálica y así podría ejercer algunos efectos directamente sobre el CNS, lo que fue confirmado por Nunes et al. 2010 (NUNES, K.P., et al. J. Sex Med, 7: 3879-88, 2010).

El glutamato (L-glutamato o L-glu) es el principal y más abundante neurotransmisor excitador del CNS en mamíferos. Ejerce un papel crucial en los mecanismos que subyacen a la plasticidad sináptica, que son parte de la base fisiológica de los procesos conductuales, como la cognición y la memoria. L-glu también realiza funciones relevantes en el desarrollo del sistema nervioso como formación, remodelación, eliminación de sinapsis, migración, proliferación, diferenciación neuronal y muerte celular ((PRYBYLOWSKI, K. et al. J Biol Chem. 279, 9673-6, 1994; MCKINNEY, R.A.. Journal Physiology. 588 (1),107-116, 2010; MANENT, J.B., REPRESA, A. The Neuroscientist, 13(3), 268-279, 2007; SCHLETT, K. Current Topics Medicinal Chemistry. 6(10), 949-960, 2006; VECINO, E. et al. The International Journal of Developmental Biology. 48 (8-9), 965-974, 2004). Además, el glutamato puede facilitar la erección del pene activando algunas áreas cerebrales que están involucradas en el control de la línea de función eréctil del núcleo paraventricular (PVN), el área ventral tegmentada (VTA), el hipocampo, entre otros (ARGIOLAS, A., MELIS, M.R.. Prog. Neurobiol. 47, 235-255, 1995; SONG, Y., RAJASEKARAN, M. Urology. 64(6), 1250-1254, 2004; MELIS M.R., ARGIOLAS A. Neuroscience and Biobehavioral. Reviews 35, 939-955, 2011; UCCU, S. et al. Neuropharmacology. 61(1-2), 181-188, 2011).

Es probable que PnTx2-6 tenga acción sobre este sistema en el cerebro, ya que las primeras pruebas de toxicidad con esta toxina se realizaron mediante inyección intracerebral, y se descubrió que causaba la erección (para revisión, véase: NUNES et al., 2009). Por otro lado, otras pruebas in vivo llevadas a cabo con la toxina con el objetivo de estudiar la potenciación de la función eréctil se realizaron con inyecciones subcutáneas o intravenosas, que dieron como resultado respuestas positivas (NUNES, 2008b, NUNES et al, 2008a). Además, Yonamine et al. encontraron que el PnTx2-6 yodado puede penetrar en la barrera hematoencefálica y así ejercer algunos efectos directamente sobre el CNS. Nuestro grupo también mostró que PnTx-6 marcado por el tecnecio e inyectado periféricamente, aunque se concentra en el pene, también aparece en una pequeña cantidad en el tejido nervioso, haciendo creer que al menos una parte del mismo cruza la barrera hematoencefálica (NUNES et al. al., 2010a). Los estudios sobre la acción de la toxina en la barrera hematoencefálica se encuentran en la fase inicial, con el objetivo de comprender la posible entrada de esta toxina en el CNS. Lo que se sabe es que la toxina PnTx2-6 inyectada por ambas vías periférica y central es capaz de inducir la erección. Se deben verificar los mecanismos por los cuales se lleva a cabo esta acción.

El resultado concreto de la acción periférica de la toxina sobre la erección se refiere a la relajación de las porciones del cuerpo cavernoso cuando la toxina se aplica directamente sobre esta preparación in vitro (NUNES et al., 2010a, 2010b, 2012).

Matavel et al (2009), utilizando herramientas de modelado molecular, indicaron algunos aminoácidos del PnTx2-6, en epítopo desconocido, que supuestamente interactúa con el canal de sodio. En este contexto, la síntesis química de una secuencia peptídica parcial del PnTx2-6 que abarca estos aminoácidos abre nuevas perspectivas para las caracterizaciones estructurales y farmacológicas de la interacción de las moléculas con sus receptores. Además, la síntesis peptídica, relativamente simple y con posibilidad de alto rendimiento, podría proporcionar el material necesario para el estudio farmacológico en diferentes tejidos, superando la limitación observada con el material obtenido por purificación del veneno o incluso por expresión heteróloga, que es difícil y costoso (MATAVEL, A. et al. Biochemistry 48(14), 3078-3088, 2009). Por lo tanto, en la presente tecnología se ha desarrollado el péptido sintético modificado PnTx(19), que exhibe una cadena polipeptídica corta de 19 aminoácidos, que permite obtenerla fácilmente con fines comerciales, proporcionando el desarrollo de composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de la disfunción eréctil y/o en la potenciación de la función eréctil. Además, en la presente tecnología se demostró que este péptido induce la liberación de glutamato en sinaptosomas cerebrocorticales de ratas, estimula la relajación de cortes de cuerpos cavernosos de ratones y ratas, exhibe un menor efecto tóxico con respecto a la toxina nativa de la cual se deriva, y además no muestra toxicidad cardíaca, a diferencia del Viagra presente en el mercado. También es efectivo en animales hipertensos y exhibe baja inmunogenicidad.

En la técnica anterior, existen nuevas formulaciones a base de polipéptidos derivados del veneno de araña, como se divulga en la solicitud WO2009083808, titulada "COMPOSITINS AND METHODS FOR TREATING ERECTILE DYSFUNCTION", que describe composiciones que comprenden un polipéptido aislado del veneno de la araña viuda negra (Latrodectus mactans) y fragmentos biológicamente activos de los mismos. Sin embargo, no se encontró ningún péptido similar al de la presente invención para el tratamiento de la disfunción eréctil.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Cromatografía de fase inversa en sistema de HPLC de los productos de la síntesis del péptido PnTx(19). Columna preparatoria Sphasil péptido C8 5µ ST 4,6/100, equilibrado con agua Milli-Q 0,1 % TFA (en volumen) eluído con un gradiente de 0 a 25 % de solución B (0,1 % TFA/acetonitrilo v/v) en 3 minutos, 25 a 35 % de B en 30 minutos y 35 a 100 % de la solución B en 5 minutos, a una rata de flujo de 2,0 ml/minuto.

Figura 2: Espectrometría de masas de la fracción que contiene el péptido sintético PnTx(19). La masa molecular del PnTx(19) de 2484.9 Da fue determinada por MALDI-TOF.

Figura 3: Viabilidad sinaptosomal: verificada por la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, que oxida el NADH a NAD+. Este último determina una reducción en la lectura (339nm), que permite calificar la actividad enzimática. La mezcla de reacción se incubó durante 60 minutos con PnTx(19) (10-5 M; 3x10-5 M; 10-6 M; 3x10-6 M) y el porcentaje de actividad evaluado con respecto a la lisis provocada por Triton X-100, considerado= 100 % de lisis. La actividad de esta enzima es proporcional a la rotura de los sinaptosomas, ya que se trata de una enzima del compartimento intracelular.

Figura 4: Efecto de diferentes concentraciones del PnTx(19) en la liberación de L-glutamato - Placa ELISA que contiene 300 µl/pozo de la mezcla de sinaptosoma (10 % del volumen final) y NADP+ (concentración final de 1 mM) en KRH con calcio (2 mM), se monitorizó y se mantuvo a 37 ºC bajo agitación constante. Se llevó a cabo la lectura de la fluorescencia en el espectrofluorímetro durante 2.460 segundos. La enzima GDH (35 unidades para el volumen final de 300 µl) se añadió a los pozos a los 60 segundos; a los 660 segundos, en diferentes pozos, se agregaron diferentes concentraciones de PnTx(19) ("10-5M, 3x10-5 M, 10-6 M y 3x10-6 M") y el KCl (33 mM). Como controles negativos, se usaron pozos que contienen sinaptosomas sin tratar con la toxina. Los resultados exhiben el promedio y el error estándar de dos experimentos independientes, llevados a cabo por triplicado. * P<0,05 representan los niveles de significancia de los ensayos en comparación con el control, representado por los sinaptosomas no tratados.

Figura 5: Efectos de la toxina PnTx2-6 y del péptido PnTx(19) (1x10-6M) sobre la relajación de las tiras de los elementos cavernosos de los ratones. Las tiras se precontrajeron con fenilefrina (10-5 M) y se relajaron con acetilcolina (10-4M) control, PnTx2-6 (5x10-8M) y PnTx(19) (x10-6 M) (n=3).

Figura 6: Efectos del péptido PnTx-19 y de la toxina PnTx2-6 en la corriente cardíaca de sodio. A: Efecto de la toxina PnTx2-6 en el pico de corriente de sodio (flecha negra) y en la corriente de inactivación (flecha gris). C: efecto del péptido PnTx-19 en el pico de la corriente de sodio y en la corriente de inactivación. D: Curso de tiempo de pico en la corriente de sodio, durante la perfusión de PnTx-19 y PnTx-26. Cada círculo negro indica la amplitud del Ina, medida cada 1 segundo en un potencial de membrana de -20 mV. Las barras grises indican el momento en que la célula se expuso a PnTx2-6 o PnTX-19 (péptido). Los gráficos de barras resumen los efectos de PnTx2-6 500 nM (n=7) y del péptido PnTx-19 (péptido) 1 µM (n=12) en la constante de descomposición (E) y la reducción de la corriente de sodio (F). Las barras indican promedio ± SEM, * p<0,05 con respecto a los controles.

Figura 7: Curva de dosis de respuesta del péptido PnTx-19 y de la toxina PnTx2-6 en la presión ventricular derecha (A) y (B), derivada ±dP/dt (C y D) y frecuencia cardíaca (E) de las ratas.

Figura 8: Análisis del título de anticuerpos. A) Control: adyuvante (hidróxido de aluminio). B) título de anticuerpos después de la administración del péptido PnTx-19 (10 µG) en días diferentes.

Descripción detallada de la tecnología

La presente invención comprende el péptido PnTx(19), NH3-GERRQYFWIAWYKLANSKK-COOH (SEQ ID No.1), sintetizado químicamente utilizando la estrategia de síntesis Fmoc/t-butilo sobre soporte sólido (MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. (32), 221-296, 1969). El péptido tiene 19 residuos de aminoácidos, es lineal y se diseñó a partir de la probable estructura tridimensional del PnTx2-6 propuesto después del análisis para estudios de bioinformática y modelado molecular. Esto abarca el "núcleo" hidrófobo y los residuos positivamente graficados que rodean esta región, los cuales, de acuerdo con los estudios de modelado molecular, son responsables de la interacción de la toxina con el canal de sodio (MATAVEL et al., 2009). La secuencia (epítopo discontinuo) desarrollada a partir de estos estudios de modelado molecular experimentó modificaciones cruciales en la presente invención, de modo que se pudo mantener su actividad en la función eréctil: el aminoácido cisteína, en la posición 17, se reemplazó por serina, y el péptido se sometió a amidación en la porción terminal C y fue acetilada en la porción terminal N, con la visión de aumentar la solubilidad de la misma.

Las pruebas de actividad demostraron que PNTx(19), al igual que PnTx2-6, interfiere con el sistema glutamatérgico en los sinaptosomas cerebrocorticales de ratas.

Se usaron diferentes concentraciones del péptido, y se encontró que, en la dosis de 3x10-5M, PnTx(19) indujo un aumento en la liberación de glutamato en sinaptosomas cerebrocorticales de ratas (Figura 4).

La acción del péptido en la erección se verificó mediante el uso de tiras de cuerpos cavernosos aislados de ratones. PnTx(19) 1 µM proporcionó una relajación significativa de la tira del cuerpo cavernoso de ratones, aproximadamente 80 % (Figura 5), una acción similar a la provocada por 50 nM de PnTx2-6 y 100 µM de acetilcolina. Probablemente, la relajación del cuerpo cavernoso se debe a la conexión del péptido lineal a los canales de sodio en el cuerpo cavernoso, desencadenando los sucesos posteriores en la ruta de erección.

El desarrollo del péptido sintético PnTx(19) permite obtener las mayores cantidades de la molécula activa con la posibilidad de disminuir los efectos tóxicos con respecto a la toxina nativa PnTx2-6, que proporciona el desarrollo de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de disfunción eréctil y/o en la potenciación de la función eréctil.

Tales composiciones farmacéuticas se caracterizan por comprender un péptido sintético y un excipiente o una mezcla de excipientes farmacéuticamente aceptables, en los que el péptido puede estar presente en forma libre o acoplado a sistemas de liberación controlada. Los sistemas de liberación controlada pueden incluir liposomas, ciclodextrinas, polímeros biodegradables, cápsulas, micro y nanocápsulas, micropartículas y nanopartículas, preparaciones en bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, lipoesferas, sistemas de administración transdérmica y/o líquidos que, cuando son sometidos a cambios en temperatura, forman un sólido o un gel in situ. De esta manera, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, tópica, intramuscular, intravenosa, subcutánea, por inhalación, o mediante dispositivos implantables.

La presente invención se puede entender mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no son limitativos de la tecnología.

Ejemplo 1: síntesis química en fase sólida y purificación del péptido PnTx(19)

El péptido sintético llamado PnTx(19) (NH3-GlyGluArgArgGlnTyrPheTrpIleAlaTrpTyrLysLeuAlaAsnSerLysLys-OOOH) se diseñó parcialmente mediante el uso del programa bioinformático PEPOP. De esta manera, se propuso un epítopo discontinuo que contiene 19 aminoácidos para la toxina PnTx2-6 (FLEURY, Cécile, Bioinformatics tools dedicated to the study of the structure-function-antigenicity relationship in animal peptide toxins. Tesis doctoral, Departamento de Bioquímica e Inmunología de la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 180 p., 2009).

Con la visión de aumentar la solubilidad del péptido, en la presente tecnología se ha sintetizado el PnTx(19) con modificaciones en la porción terminal N (acetilación) y la porción terminal C (amidación). El péptido PtTx(19) acetilado y amidado demostró ser soluble en agua.

El péptido PnTx(19) se purificó por cromatografía de fase inversa (HPLC ÄKTA Explorer 10). El perfil cromatográfico presentado en la Figura 1 demuestra la presencia de subproductos de síntesis y la fracción referida al PnTx(19), que eluye con regulador B al 29 %. Después de la purificación, el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF) mostró solo un grupo de especies moleculares en el espectro, cuya masa molecular era de 2484,970 Da (Figura 2), compatible con la masa esperada para el péptido PnTx(19).

Ejemplo 2: Prueba de viabilidad sinoptosomal

Se decapitaron ratas adultas (240-300 g), los cerebros se extrajeron rápidamente, se sumergieron en solución de homogeneización (sacarosa 0,32 M, EDTA 1Mm y ditiotreitol (DTT) 0,25 mM, pH=7,4) y se guardaron en hielo, luego se usaron para preparar los sinaptosomas, como se describió previamente por Dunkley et al 1988 (DUNKLEY, PR, Brain Research, 441, 59-71, 1988).

Como control de la viabilidad de los sinaptosomas y también para verificar una posible actividad lítica del péptido, se llevaron a cabo pruebas de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, de acuerdo con Kubowistz, Ott, 1943 (KUBOWISTZ, F., OTT, C. Biochem Z. 319, 94-117, 1943).

La actividad de LDH se evaluó en condiciones de control, en presencia de Triton X-100 al 1 % (100 % de lisis) y en presencia de PnTx(19) en las siguientes concentraciones 10-5 M; 3x10-5 M; 10-6 M; 3.x10-6 M.

Los resultados de la Figura 3 demuestran que el péptido no afecta la viabilidad sinaptosómica y/o la maquinaria exocítica, ya que los valores obtenidos fueron del 3,4 % de lisis para la concentración de 10-5 M; 2 % de lisis para la concentración 3x10-5 M; 6 % de lisis para la concentración 10-6 M; 9 % de lisis para la concentración de 3x10-6 M, valores comparables con el control (ausencia del péptido).

Ejemplo 3: Efectos de la toxina PnTx2-6 y del péptido PnTx(19) sobre tiras de cuerpos cavernosos de ratones

Los ratones fueron sacrificados por decapitación, su pene fue removido quirúrgicamente y colocado en una placa de Petri que contiene bicarbonato Krebs Ringer (NaCl, 118,1; KCl, 4,7; KH2PO4, 1,0; MgSo4, 1,0: NaHCO3, 25,0; CaCl2, 2,55; y Glucosa, 11,1mM), burbujeado con una mezcla de O2 al 95 % y CO2 al 5 %. La glándula, el cuerpo esponjoso y la uretra se eliminaron y los cuerpos cavernosos se disecaron con la eliminación de la túnica albugínea y se separaron cortando el tabique fibroso entre ellos. Las tiras de cuerpos cavernosos que miden aproximadamente 1x1x7 mm se montaron por separado en una cámara, un extremo del mismo se aseguró a un electrodo y el otro se unió a un transductor.

Las cámaras contenían Krebs (pH 7,4) a 37 ºC, equilibrado con O2 al 95 % y CO2 al 5 %.

El tejido se estiró con una fuerza pasiva de 2,0 mN y se estabilizó durante 60 minutos, reemplazándose la solución cada 15 minutos. Los cambios en la fuerza isométrica se registraron utilizando un transductor de fuerza isométrica (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, Estados Unidos), conectado a un amplificador (modelo TBM-4, World Precision Instruments, Inc., Estados Unidos), utilizando software Adquisición de datos WinDaq (Dada®

Instruments, Estados Unidos). Para evaluar la capacidad contráctil de las preparaciones, se añadió una solución de KCl (120 mM) a los cortes de cuerpos cavernosos y luego la preparación se lavó con Krebs tres veces.

Los cortes de cuerpo cavernoso se precontrajeron con fenilefrina (100-5 M) y la relajación fue provocada por acetilcolina 10-4M (control), PntX2-6 (5x10-6M) y el péptido PnTx(19) (1x10-6M).

La Figura 4 muestra que la toxina PnTx2-6 (5x10-8 M) y el péptido PnTx(19) (10-6 M) inducen relajación del 83 %, mientras que el control con acetilcolina (10-4 M) indujo 81,6 % de relajación en tiras de cuerpos cavernosos de ratones precontraídos por fenilefrina (10-5M). Estos resultados indican que tanto la toxina PnTx2-6 como el péptido PnTx(19) son activos en los trozos relajados de los cuerpos cavernosos de los ratones.

Ejemplo 4: Efecto del péptido sintético PnTx(19) en la liberación de L-glutamato

La liberación de L-glutamato se analizó de acuerdo con la propuesta de Nicholls et al. 1987 (NICHOLLS, D. et al. J. Neurochem. 49, 5057, 1987). Con el fin de evaluar si el péptido era capaz de inducir la liberación de L-glutamato en sinoptosomas cerebrocorticales de ratas, al igual que la toxina nativa, se analizó su efecto en las siguientes concentraciones: 10-5M, 3x10-5M, 10-6M, y 2x10-6 M, Figura 5.

A partir de estos resultados, se observa que, en las condiciones experimentales, solo a la concentración de 3x10-5M el péptido era capaz de inducir una liberación significativa de L-glutamato, en comparación con el control (ausencia de PnTx19).

Ejemplo 5: Efectos del péptido PnTx-19 en el corazón

Efecto en la corriente de sodio

Se llevaron a cabo experimentos de pinza con parche con la visión de analizar los efectos de la toxina PnTx2-6 y del péptido PnTx-19 en los canales de Nav1.5 de sodio, presente en cardiomiocitos. Los registros evidenciaron que la toxina PnTx2-6 causa una disminución en el pico de corriente de sodio, retrasando la corriente de inactivación. Estos efectos no se observaron para PnTx-19 (Figura 6A y C). En la Figura 6B, se observa que PnTx2-6 promovió una reducción de la densidad de la corriente de sodio, y este fenómeno no se observó en presencia del péptido (Figura 6 D).

Efecto sobre la presión ventricular, la frecuencia cardíaca y la derivada ±dP/dt

Las ratas se mantuvieron bajo un ciclo controlado de 12 horas de luz/oscuridad a una temperatura estable con acceso libre a agua y alimento. Fueron decapitados de 10 a 15 minutos después de la inyección intraperitoneal de heparina (200 UI). Se abrió el tórax, se disecó y perfundió cuidadosamente el corazón a través de una punta aórtica con solución de Krebs-Ringer (KRS) que contenía (en mmol/l) NaCl (118,4), KCl (4,7), KH2PO4 (1,2), MgSo4.7H2O (1,2), CaCl2.2H2O (1,25), glucosa (11,7) y NaHCO3 (26,5). El flujo de perfusión se mantuvo constante (10 ml/min) a 37 ºC y bajo oxigenación constante (CO2 al 5 % y O2 al 95 %). Se insertó un globo conectado a un transductor de presión en el ventrículo derecho, y se monitorizó la presión ventricular, la frecuencia cardíaca y la derivada ±dP/dt (Figura 7). El volumen del globo se ajustó a una presión diastólica final de aproximadamente 10 mm de Hg. Después de un período para alcanzar el equilibrio (30 a 40 minutos), se inyectaron 100 µmol/l de portador (control), toxina a concentraciones de 37,8 nmol/l-3,78 µmol/l o un péptido a concentraciones de 37,8 nmol/l-37,8 µmol/l en regulador de perfusión.

Como se muestra en la Figura 7, la toxina indujo un aumento dependiente de la concentración, bajo la presión sistólica final del ventrículo derecho (RFVSP/PVSFD) y en +dP/dt, Y -dp/dt, como máximo en 66,7 ± 13,55 %, y 61,6 ± 9,89 %, respectivamente (Figura 7 A; C y D). Sin embargo, la toxina no alteró la presión diastólica final y la frecuencia cardíaca. Por el contrario, el péptido no alteró ninguno de estos parámetros, incluso a altas concentraciones (Figura 7B y E).

Los resultados son el promedio ± SEM. Los análisis de la varianza unidireccional (ANOVA), seguidos de la prueba posterior de Newman-Keuks, se usaron para analizar los parámetros en corazones aislados. Para análisis estadísticos se consideró $p < 0,05$.

Ejemplo 6: Inmunogenicidad del péptido PnTx-19

Ratones suizos, machos, de 20-23 gramos se dividieron en 2 grupos (Control-Adyuvante: hidróxido de aluminio Figura 8A y PnTx-19 -10µG Figura 8B), conteniendo cada grupo 4 animales. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea. 21, 35 y 49 días desde la primera inoculación, los ratones recibieron un refuerzo de las preparaciones mencionadas anteriormente. Para verificar la presencia de anticuerpos contra el PnTx-19, el suero recogido de las colas del ratón se evaluó 15, 30, 40 y 60 días después de la primera inoculación mediante el ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA), como se describe para otras preparaciones (DEL PINO, F.A.B., BRANDELLI, A., GONZALES, J.C., HENRIQUES, J.A.P., DEWES, H., Effect of antibodies against -N-acetylglucosaminidase on reproductive efficiency of the bovine tick Boophilus microplus. Vet. Parasitol. 79, 247-255, 1998).

La inmunogenicidad de PnTx19 se evaluó después de la inyección subcutánea de 10 µg de la misma (Figura 8B). No se observaron reacciones de hipersensibilidad o muerte de los animales durante los ensayos. Uno encontró un aumento menor en el título de los anticuerpos en el grupo 2 (PnTx-19, 10 µg) 60 días después de la primera inoculación del péptido (Figura 8B). Es importante señalar que la dosis de péptido de 10 µg es aproximadamente 12,5 veces mayor que la DL50 estimada para la toxina PnTx2-6 (0,79 pg/ratón) (CORDEIRO M.N., DINIZ C.R., VALENTIM A.C., VON EICKSTEDT, GILROY J., RICHARDSON M. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brasilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys). FEBS Lett. 310, 153-156, 1992).

REIVINDICACIONES

1. Un péptido sintético **caracterizado porque** comprende la secuencia GERRQYFWIAWYKLANSKK (SEQ ID No. 1).

2. El péptido sintético de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** exhibe modificaciones en la porción terminal N por acetilación y porción C terminal por amidación.

3. El péptido sintético de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como medicamento para el tratamiento de sujetos afectados por la disfunción eréctil y/o para potenciar la función eréctil.

4. Una composición farmacéutica **caracterizada porque** comprende el péptido sintético representado por la secuencia SEQ ID No.1, y un excipiente o una mezcla de excipientes farmacéuticamente aceptables.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada porque** el péptido está presente de forma libre o acoplado a un sistema de liberación controlada, seleccionado del grupo que comprende liposomas, ciclodextrinas, polímeros biodegradables, cápsulas, micro y nanocápsulas, micro y nanopartículas, preparación de bolo, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, lipoesferas, sistemas de administración transdérmica y/o líquidos que, cuando se someten a cambios de temperatura, forman un sólido o un gel in situ.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso como un medicamento para administrar por vía oral, tópica, intramuscular, intravenosa, subcutánea y por inhalación, o mediante un dispositivo implantable.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 4 y 5 para su uso como medicamento para el tratamiento de individuos afectados por la disfunción eréctil y/o para potenciar la función eréctil.

8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 para el tratamiento de personas afectadas por la disfunción eréctil y/o para potenciar la función eréctil.

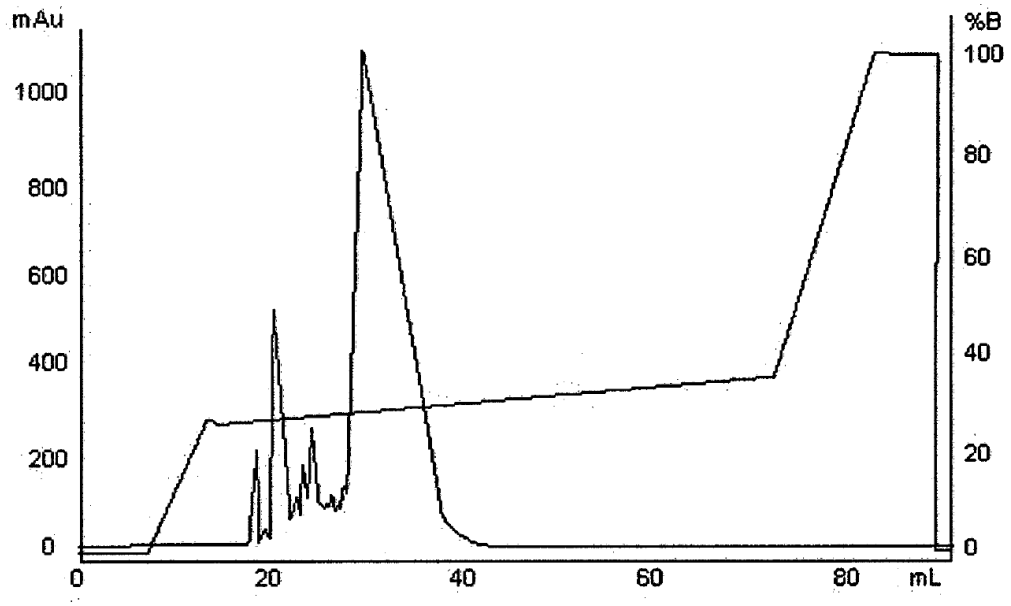

FIGURA 1

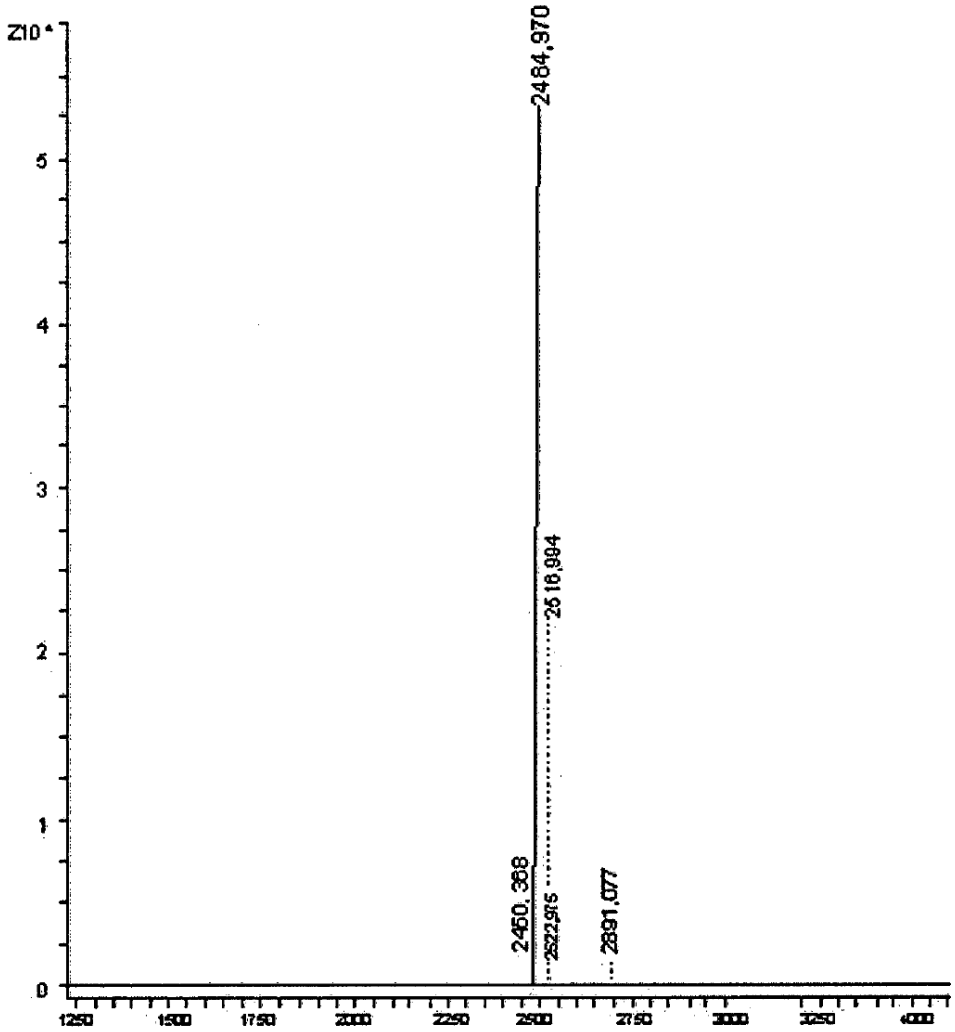
Z10⁴
5
4
3
2
1
0
2484,970
2516,994
2450,368
2522,975
2891,077
1250
1500
1750
2000
2250
2500
2750
3000
3250
4000

FIGURA 2

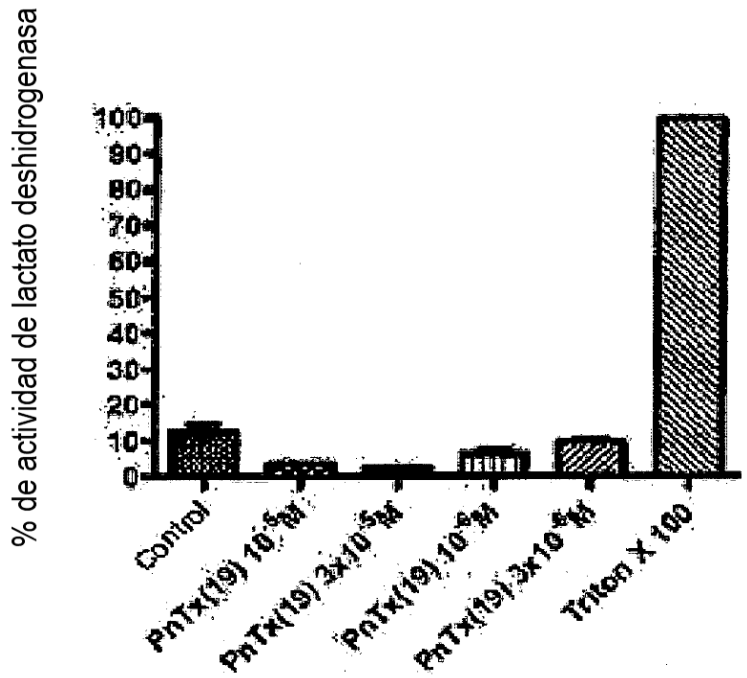

FIGURA 3

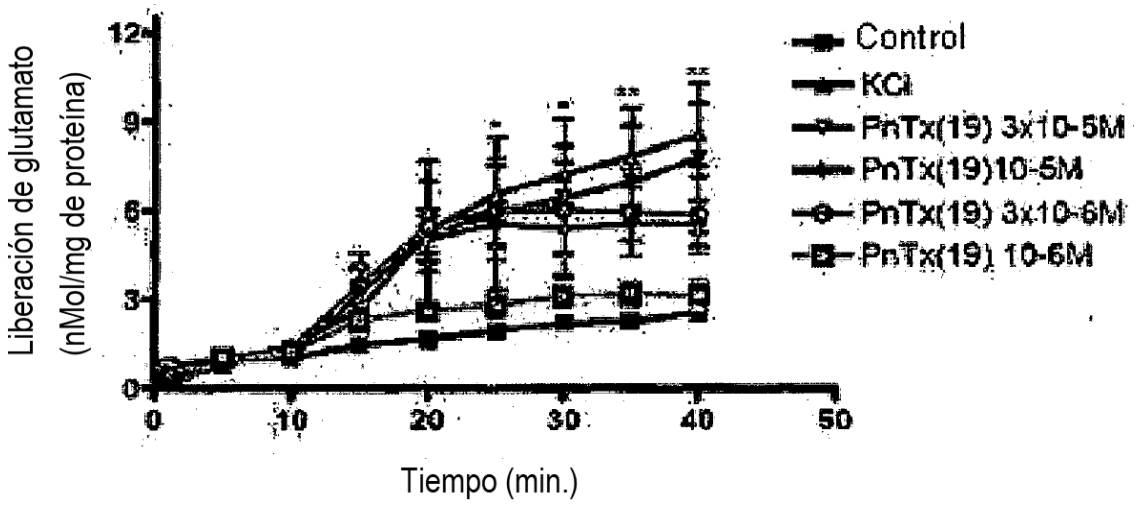

FIGURA 4

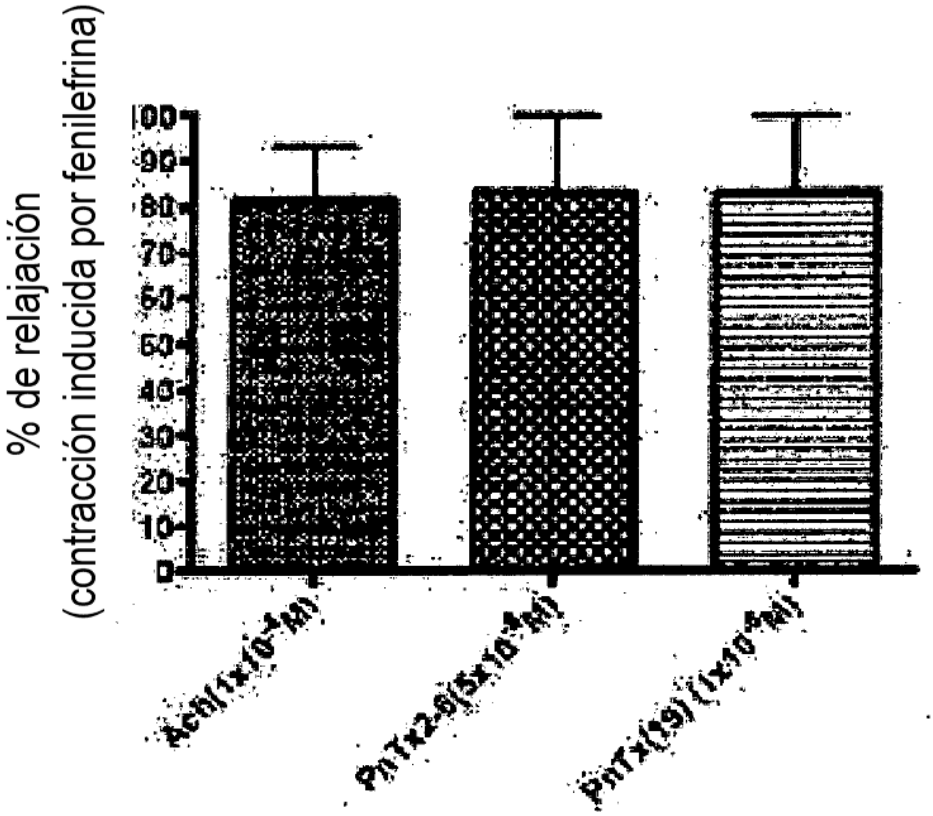
% de relajación
(contracción inducida por fenilefrina)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Ach(1x10-4M)
PnTx2-6(5x10-4M)
PnTx(19) (1x10-5M)

FIGURA 5

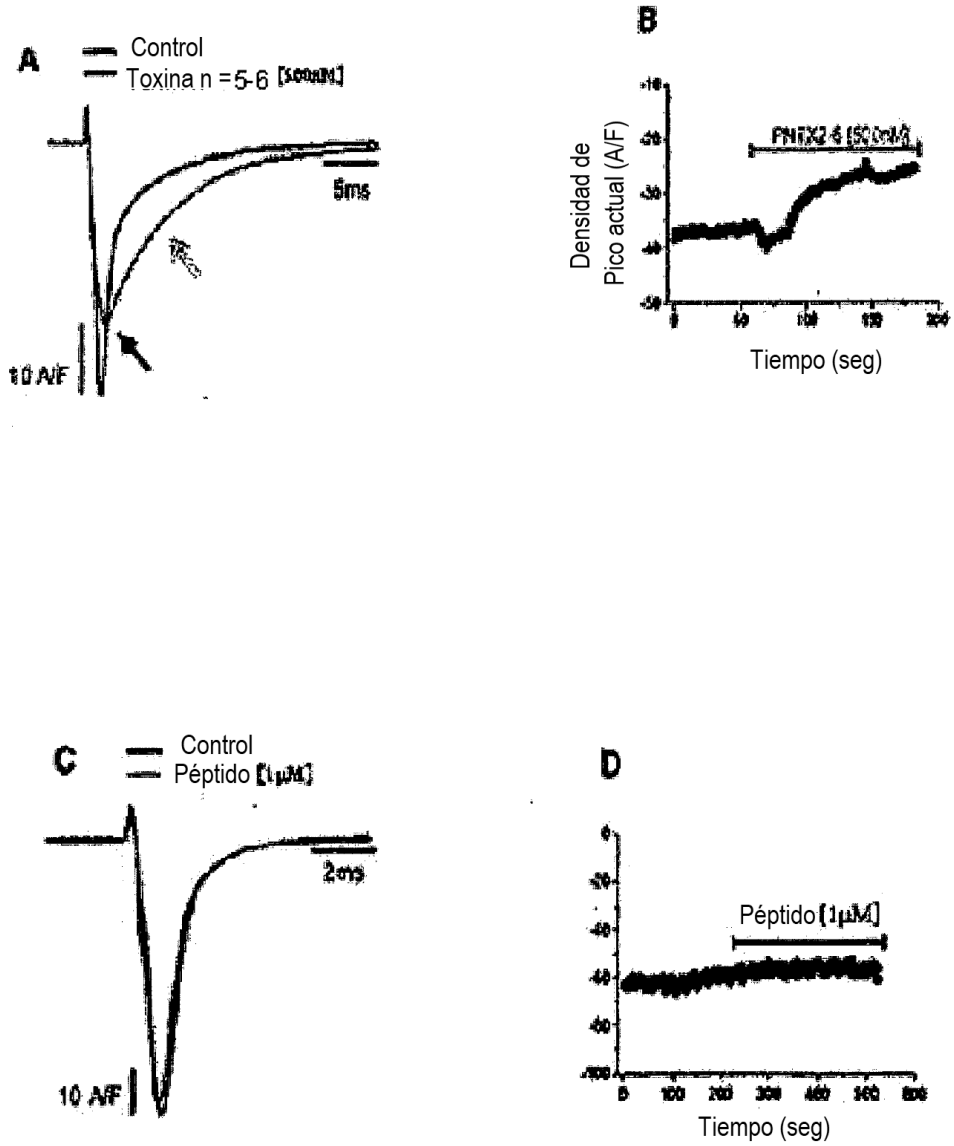
A
Control
Toxina n =5-6
5ms
10 A/F
B
Densidad de
Pico actual (A/F)
Tiempo (seg)
C
Control
Péptido [1μM]
2ms
10 A/F
D
Péptido [1μM]
Tiempo (seg)

FIGURA 6

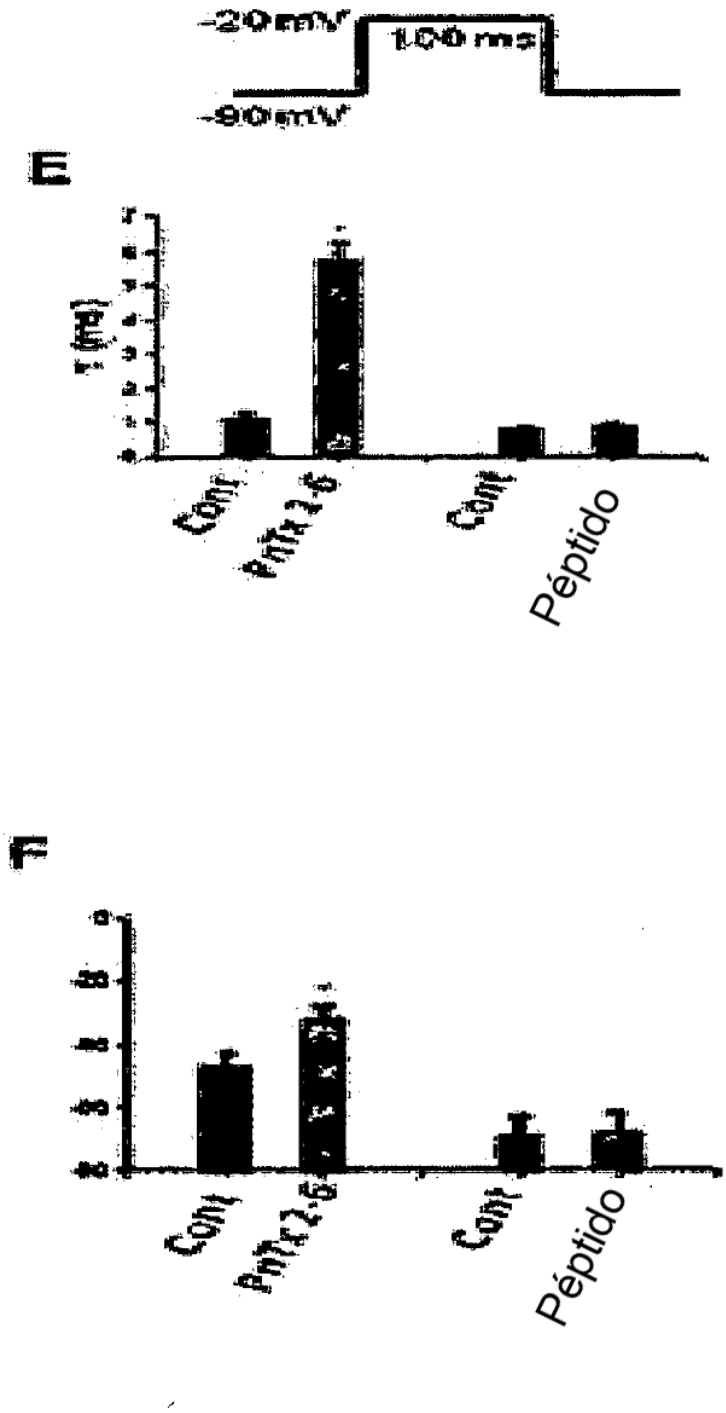

FIGURA 6 cont.

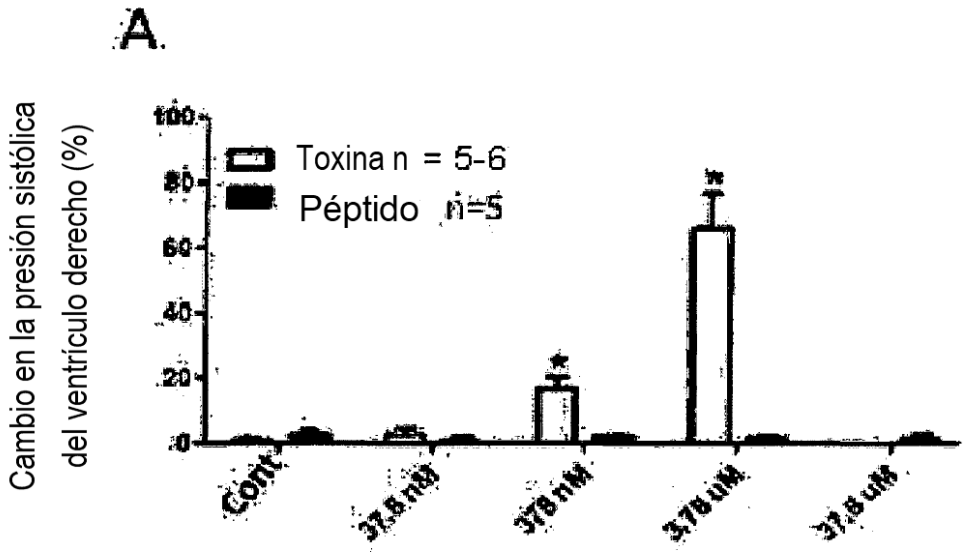

FIGURA 7

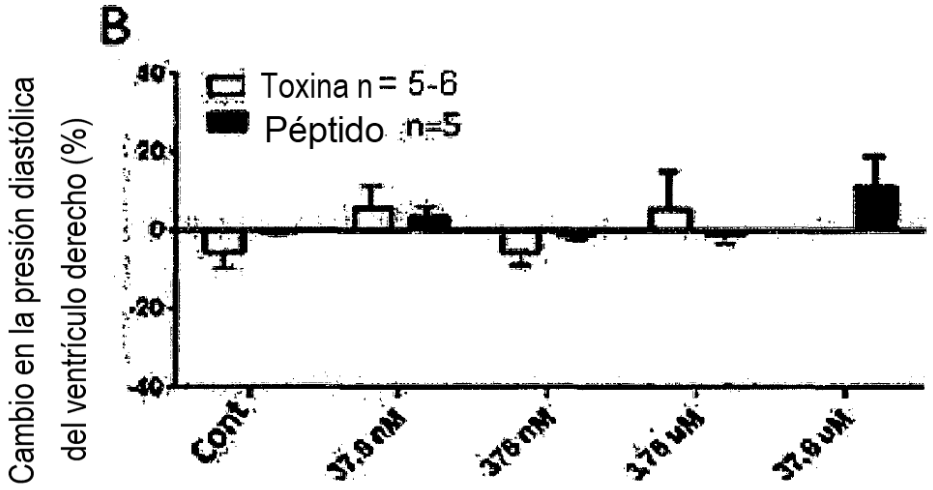

FIGURA 7 cont.

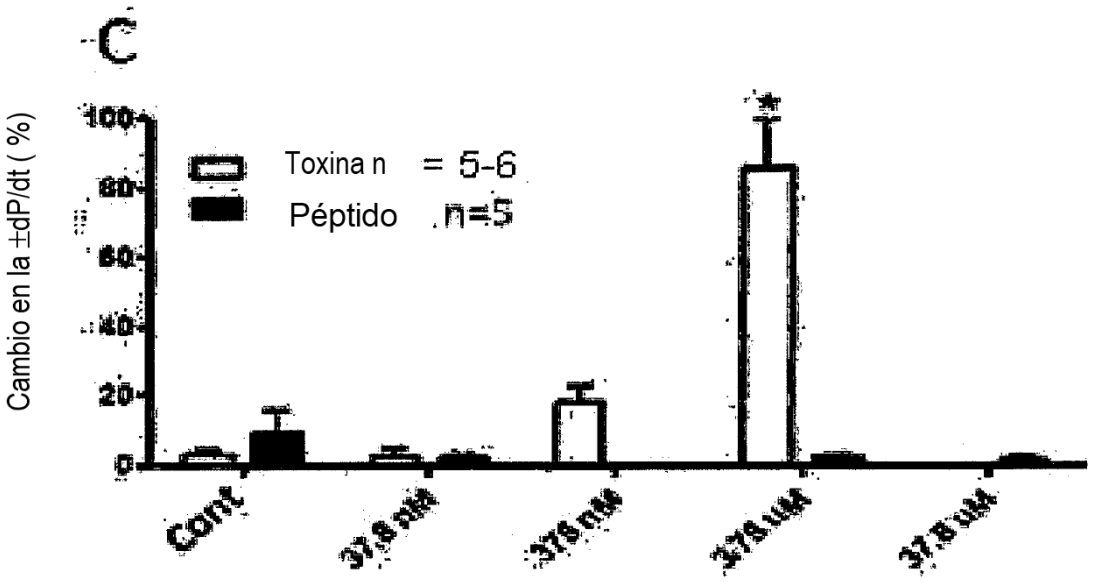

FIGURA 7 cont.

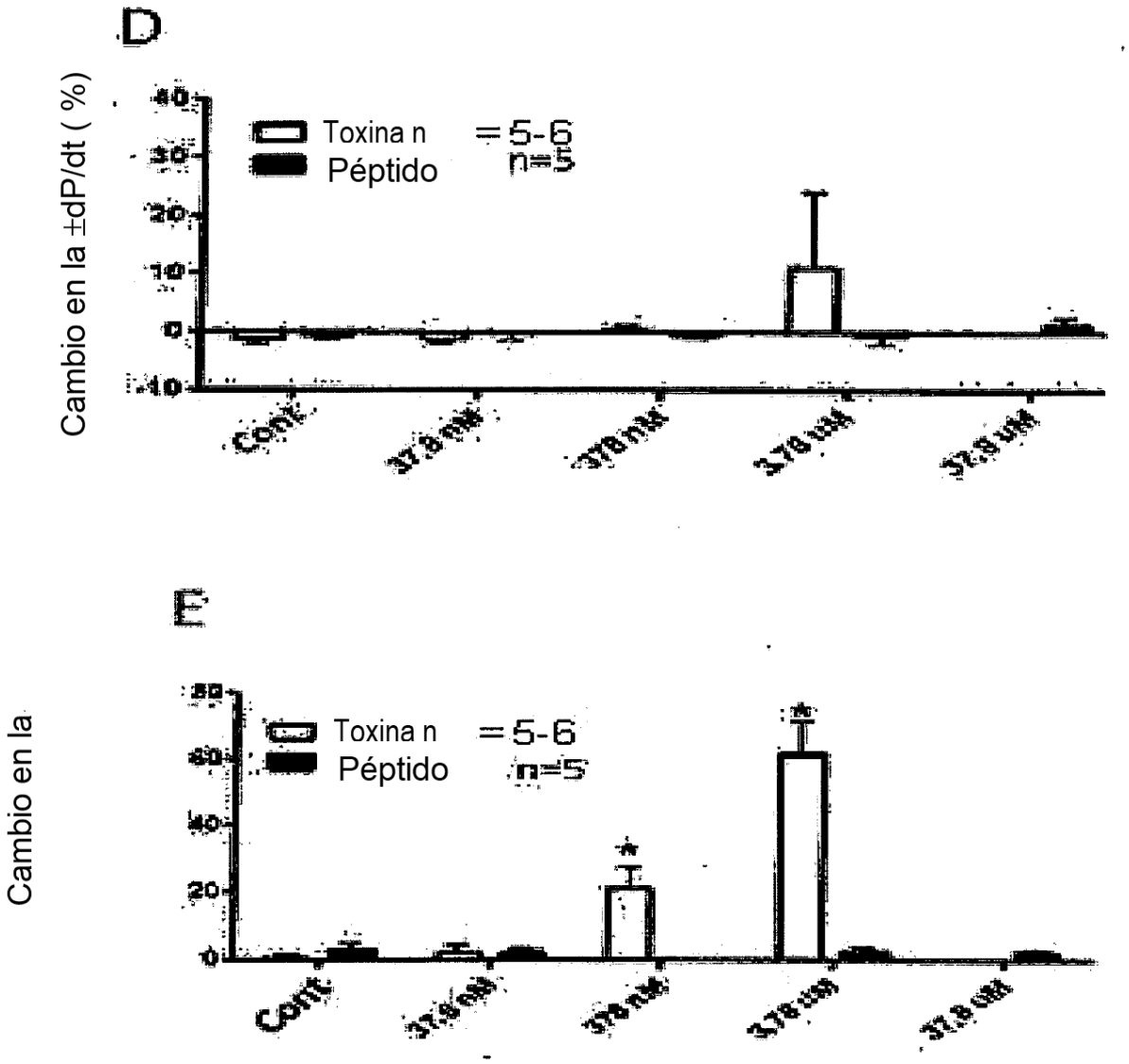

FIGURA 7 cont.

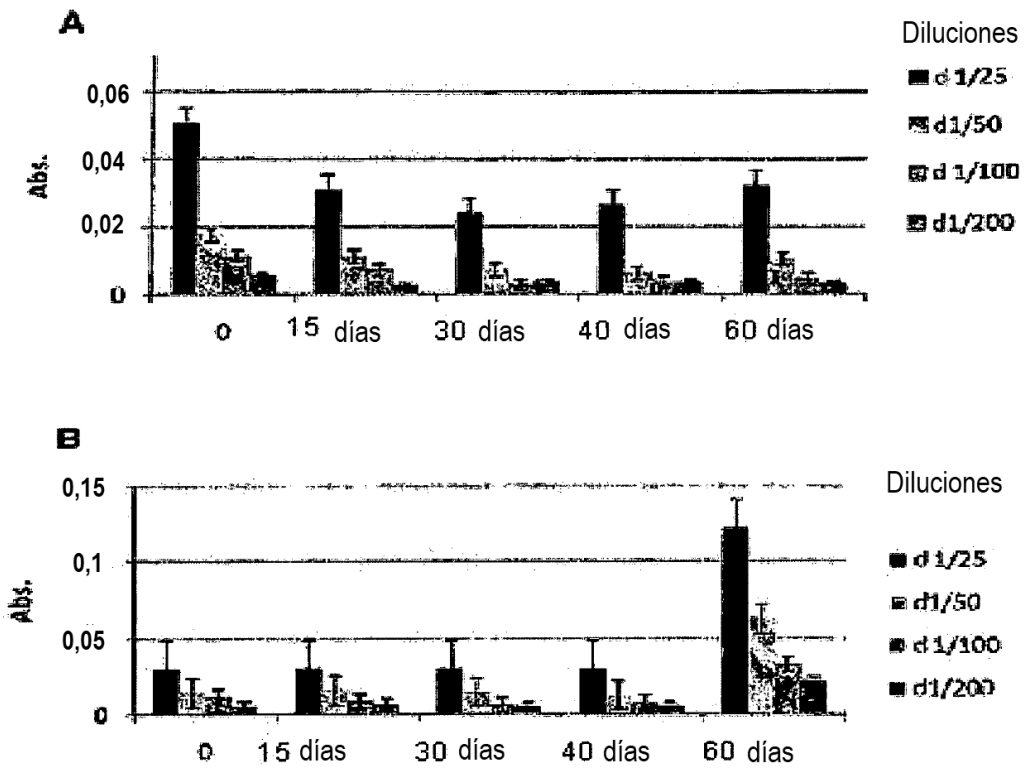
A
Diluciones
d 1/25
d1/50
d 1/100
d1/200
Abs.
0,06
0,04
0,02
0
0
15 días
30 días
40 días
60 días
B
Diluciones
d 1/25
d1/50
d 1/100
d1/200
Abs.
0,15
0,1
0,05
0
0
15 días
30 días
40 días
60 días

FIGURA 8