



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 683**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05763889 .2**

96 Fecha de presentación : **06.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1756270**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54

Título: **Diagnóstico y tratamiento de cánceres de células mieloides y linfoides.**

30

Prioridad: **06.04.2004 US 559433 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2010

73

Titular/es: **Transmolecular, Inc.**
One Perimeter Park South, Suite 400 North
Birmingham, Alabama 35243, US

72

Inventor/es: **Alvarez, Vernon, L. y**
Gonda, Matthew, A.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 339 683 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

Diagnóstico y tratamiento de cánceres de células mieloides y linfoides.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al tratamiento de trastornos mieloproliferativos y linfoproliferativos con una clorotoxina o sus derivados.

10 **Antecedentes de la invención**

Las células sanguíneas, en general, se clasifican como linfoides (por ejemplo, linfocitos, etc.) o mieloides (por ejemplo, granulocitos, monocitos, eritrocitos y plaquetas). Por consiguiente, las malignidades hematológicas se clasifican como trastornos linfoproliferativos o mieloproliferativos. Cada uno de estos trastornos se clasifica operativamente como agudo o crónico, dependiendo de la proporción de células precursoras inmaduras (blastos) en la médula ósea. En el linaje mieloide, la presencia de más del 30% de blastos en la médula ósea define la leucemia mieloide aguda. Un trastorno mieloide que no es la leucemia mieloide aguda se denomina síndrome mielodisplásico o una enfermedad mieloproliferativa crónica basándose, respectivamente, en la presencia o la ausencia de displasia morfológica de tres linajes, que implica principalmente a los eritrocitos. Las enfermedades mieloproliferativas crónicas incluyen la leucemia mielógena crónica (CML), la trombocitopenia esencial, la policitemia vera y la metaplasia mieloide agnógénica. A veces un trastorno mieloide crónico no puede clasificarse como síndrome mielodisplásico ni como enfermedad mieloproliferativa crónica. Los ejemplos incluyen CML atípica y leucemia neutrófila crónica.

Como grupo, las enfermedades mieloproliferativas crónicas están interrelacionadas porque el proceso clonal se origina al nivel de las células progenitoras mieloides y, de forma secundaria, puede producir fibrosis de la médula o sufrir una transformación leucémica. Entre las enfermedades mieloproliferativas crónicas, sólo la CML se ha caracterizado biológicamente por la presencia de una translocación genética recíproca entre los cromosomas nueve y veintidós. Una anomalía genética coherente similar no se ha asociado con las otras enfermedades mieloproliferativas crónicas, y el diagnóstico clínico se basa en la presencia o en la ausencia de ciertas características clínicas y de laboratorio. Se requiere un aumento en la masa de eritrocitos para el diagnóstico de la policitemia vera. De manera similar, la presencia de una fibrosis sustancial de la médula ósea no asociada con la CML ni con la policitemia vera es la característica de la metaplasia mieloide agnógénica. El diagnóstico de la trombocitopenia esencial es de exclusión, representando una trombocitopenia clonal que no puede clasificarse como metaplasia mieloide agnógénica, policitemia vera, síndrome mielodisplásico ni CML.

Los trastornos linfoproliferativos pueden dividirse en dos categorías principales: el linfoma no hodgkiniano que incluye más de veinte entidades discretas (véase la tabla 1), y el linfoma hodgkiniano que se localiza en los nódulos linfáticos. En la actualidad, se emplea la inmunohistoquímica para diferenciar los linfomas hodgkinianos y no hodgkinianos. En la mayoría de los casos de la enfermedad de Hodgkin, en las biopsias se descubre una célula concreta denominada célula de Reed-Sternberg. Esta célula no se encuentra habitualmente en otros linfomas, así que éstos se denominan linfomas no hodgkinianos. Los linfomas no hodgkinianos (NHL) son un grupo de malignidades linfoides con una patología y una historia natural diversas. Esta diversidad se ilustra por los diferentes subtipos histológicos y las clasificaciones de los NHL que han aparecido a través de los años. Con el avance rápido que se ha producido en nuestra comprensión de la biología de los linfomas han aparecido nuevos sistemas de clasificación que describen mejor este grupo de enfermedades.

TABLA 1

Tipos de linfoma no hodgkiniano

50 **Neoplasmas de células B**

Linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de células B

55 **Neoplasmas de células B maduras**

Linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica de células B

Leucemia prolinfocítica de células B

60 **Linfoma linfoplasmacítico**

Linfoma de células B de la zona marginal esplénica

65 **Leucemia de células pilosas**

Linfoma de células B de la zona marginal extranodal

TABLA 1 (continuación)

	Linfoma de células del manto
5	Linfoma folicular
	Linfoma de la zona marginal nodal
10	Linfoma de células B grandes difuso
	Linfoma de Burkitt
	Plasmacitoma
15	Mieloma de células plasmáticas
	<i>Neoplasmas de células T</i>
20	Leucemia prolinfocítica de células T
	Leucemia linfocítica de células T grandes granulares
	Leucemia de células NK
25	Linfoma de células NK/T extranodal
	Micosis fungoides
30	Linfoma de células grandes anaplásico cutáneo primario
	Linfoma de células T de tipo panniculitis subcutáneo
	Linfoma de células T intestinal de tipo enteropático
35	Linfoma de células T gamma-delta hepatoesplénico
	Linfoma de células T angioinmunoblástico
40	Linfoma de células T periféricas
	Linfoma de células grandes anaplásico
45	Linfoma de células T adultas

Aunque se han producido avances significativos en el tratamiento del linfoma no hodgkiniano en las últimas dos décadas aún debe desarrollarse un régimen curativo para pacientes con linfomas de células B y T. Además, una remisión duradera en pacientes tratados con diversos regímenes para linfomas de grado intermedio y alto refractarios es relativamente rara (Klimo (1988), *Chemotherapy for aggressive non-Hodgkin's lymphomas*, en DeVita *et al.* (eds.), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Lippincott, 1-12). Intentos recientes que emplean la quimioterapia supraletal combinada con radioterapia, seguido de un trasplante de médula ósea, han producido una tasa de supervivencia exenta de enfermedad a largo plazo de aproximadamente 20% (Applebaum *et al.* (1987), *J. Clin. Oncol.*, 5, 1340-1341). Sin embargo, la mayoría de los pacientes tratados de esta manera mueren de linfoma o de complicaciones relacionadas con el tratamiento. Por tanto, son necesarias nuevas estrategias para el tratamiento de los linfomas no hodgkinianos. Estas estrategias deberían tener como objetivo la maximización del efecto terapéutico acoplado con la minimización de la toxicidad.

Una estrategia implica el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos asociados a tumores como un medio para dirigir fármacos o radioisótopos hacia células tumorales. Esta estrategia es particularmente atractiva en el caso de los linfomas no hodgkinianos, puesto que las células tumorales de estos linfomas muestran una diversidad de antígenos restringidos a los tumores sobre su superficie celular que pueden estar disponibles para el transporte dirigido (McMichael (1987), *Leukocyte Typing III*, Oxford University Press, 302-363 y 432-469). De todas las malignidades que se han tratado con anticuerpos monoclonales hasta la fecha, los linfomas han producido los resultados más espectaculares. Sin embargo, la mayoría de las respuestas tumorales han sido incompletas y de duración relativamente corta. Debido a estos resultados limitados, existe la necesidad de dirigir agentes que no sean anticuerpos, que sean útiles para la detección y el tratamiento de los linfomas.

La clorotoxina es una proteína de treinta y seis aminoácidos derivada en la naturaleza del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* (DeBin *et al.* (1993), Am. J. Physiol., 264: C361-369). Se han desarrollado composiciones (véanse las patentes de EEUU 5.905.027 y 6.429.187) y métodos (véanse las patentes de EEUU 6.028.174 y 6.319.891, y el documento WO 03/101474) para diagnosticar y tratar tumores neuroectodérmicos (por ejemplo, gliomas y meningiomas) y el cáncer de próstata, basados en la capacidad de la clorotoxina para unirse a células tumorales de origen neuroectodérmico (Soroceanu *et al.* (1998), Cancer Res., 58, 4871-4879; Ullrich *et al.* (1996), Neuroreport, 7, 1020-1024; Ullrich *et al.* (1996), Am. J. Physiol., 270, C1511-C1521). El diagnóstico de los tumores neuroectodérmicos se realiza mediante la identificación de la clorotoxina marcada unida a las células tumorales, mientras que el tratamiento de los tumores neuroectodérmicos se realiza dirigiendo agentes citotóxicos vinculados con la clorotoxina hacia los tumores. La presente invención expande esta área de terapéutica proporcionando una composición para tratar trastornos mieloproliferativos y linfoproliferativos basándose en el descubrimiento de que la clorotoxina y sus derivados se unen a células de cáncer mieloides y linfoides.

Sumario de la invención

La invención incluye un método para detectar la presencia de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero que comprende (a) poner en contacto una muestra biológica aislada a partir del mamífero, con una composición que comprende la clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), y (b) detectar la presencia de unión de la composición a la muestra, en el que la presencia de unión indica la presencia de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en el mamífero.

La invención también incluye una composición que comprende una clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8) para su uso en el diagnóstico de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero, en la que la composición se administra al mamífero, y la detección de la unión de la composición en el mamífero indica la presencia de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en el mamífero.

La invención incluye una composición que comprende una clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), para su uso en el tratamiento de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero, en la que la clorotoxina o su fragmento está unido a un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

La invención incluye el uso de una composición que comprende una clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero, en la que la clorotoxina o su fragmento está unido a un agente citotóxico.

Los trastornos linfoproliferativos pueden ser un linfoma no hodgkiniano, e incluyen casos en los que el linfoma no hodgkiniano es un neoplasma de células B, y el neoplasma de células B es un linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de células B o un neoplasma de células B maduras. Los ejemplos de neoplasmas de células B maduras incluidos en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células B de la zona marginal esplénica, leucemia de células pilosas, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal nodal, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, y mieloma de células plasmáticas.

El linfoma no hodgkiniano puede ser un neoplasma de células T. Los ejemplos de neoplasmas de células T incluyen, pero no se limitan a leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica de células T grandes granulares, leucemia de células NK, linfoma de células NK/T extranodal, micosis fungoides, linfoma de células grandes anaplásico cutáneo primario, linfoma de células T de tipo panniculitis subcutáneo, linfoma de células T intestinal de tipo enteropático, linfoma de células T gamma-delta hepatoesplénico, linfoma de células T angioinmunoblástico, linfoma de células T periféricas, linfoma de células grandes anaplásico, y linfoma de células T adultas.

El trastorno mieloproliferativo puede seleccionarse del grupo que consiste en policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), metaplasia mieloide agnógena (AMM), también denominada mielofibrosis idiopática (IMF), y leucemia mielógena crónica (CML).

Cuando la invención se refiere al diagnóstico, la clorotoxina o su derivado puede estar unido a un segundo polipéptido. El segundo polipéptido puede comprender un dominio de unión que se une específicamente a un epítopo expresado sólo por una célula de cáncer mieloide o linfóide, y puede ser un anticuerpo o su fragmento y/o un dominio de estabilización que evite la degradación del polipéptido de fusión. Los ejemplos de dominios de estabilización incluyen, pero no se limitan a polihistidina y albúmina de suero humana. Cuando la invención se refiere al tratamiento, la clorotoxina o su derivado está unida a un agente citotóxico. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a gelonina, ricina, saponina, exotoxina de pseudomonas, proteína antivírica de la hierba carmín, toxina de la difteria y proteínas del complemento. En la invención, la clorotoxina o su derivado puede estar marcado, y el marcador puede ser ¹³¹I. La cantidad de clorotoxina administrada en la invención puede comprender entre aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 2,0 mg/kg de peso corporal.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de un análisis FACS de células de cáncer linfoides (linfocitos B (Raji) y linfoblastos B (Daudi) del linfoma de Burkitt) tratadas con clorotoxina o con un fragmento peptídico de clorotoxina previamente identificado como el dominio de unión (péptido 21 (SEQ ID NO:10) y péptido 8 (SEQ ID NO:8)).

La figura 2 muestra los resultados de un análisis FACS de células de cáncer linfoides (linfoblastos T (Molt-4) de la leucemia linfoblástica aguda) tratadas con clorotoxina o con un fragmento peptídico de clorotoxina previamente identificado como el dominio de unión (péptido 21 (SEQ ID NO:10) y péptido 8 (SEQ ID NO:8)).

La figura 3 muestra los resultados de experimentos que demuestran los efectos sinérgicos dependientes de la dosis de la clorotoxina en combinación con doxorrubicina sobre la proliferación de células Raji.

La figura 4 muestra los resultados de experimentos que demuestran los efectos sinérgicos dependientes de la dosis de la clorotoxina en combinación con doxorrubicina sobre la proliferación de células Daudi.

Descripción detallada de la invención

Se ha determinado que la clorotoxina y su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY se une específica y selectivamente a células de cáncer mieloides y linfoides. Por tanto, la presente invención incluye el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas y linfoproliferativas poniendo en contacto la célula de cáncer mieloide o linfóide con una cantidad eficaz de clorotoxina o su fragmento.

La inhibición o la detención de la proliferación celular asociada con una enfermedad mieloproliferativa o linfoproliferativa puede servir para potenciar las defensas naturales dentro del sujeto. Por ejemplo, la detención o la inhibición del crecimiento de las células del cáncer potencia la capacidad del sistema inmunológico para organizar una respuesta más eficaz frente al cáncer.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “enfermedad mieloproliferativa”, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un crecimiento de células mieloides que es independiente de los mecanismos reguladores normales. Esto incluye el crecimiento y/o la proliferación anómalos de células mieloides en estados benignos y malignos de enfermedades neoplásicas. La inhibición del crecimiento celular anómalo puede producirse a través de una diversidad de mecanismos que incluyen, pero no se limitan a la muerte celular, la apoptosis, la detención de la mitosis, la inhibición de la división celular, la transcripción, la traducción, la transducción, etc. Los ejemplos de enfermedades mieloproliferativas incluyen, pero no se limitan a policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), metaplasia mieloide agnógena (AMM), también denominada mielofibrosis idiopática (IMF), y leucemia mieloide crónica (CML).

Tal como se emplea en la presente, la expresión “enfermedad linfoproliferativa”, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un crecimiento de células linfoides que es independiente de los mecanismos reguladores normales. Esto incluye el crecimiento y/o la proliferación anómalos de células linfoides en estados benignos y malignos de enfermedades neoplásicas. La inhibición del crecimiento celular anómalo puede producirse a través de una diversidad de mecanismos que incluyen, pero no se limitan a la muerte celular, la apoptosis, la detención de la mitosis, la inhibición de la división celular, la transcripción, la traducción, la transducción, etc.

En una realización, el trastorno linfoproliferativo es un linfoma no hodgkiniano. En otra realización, el linfoma no hodgkiniano es un neoplasma de células B seleccionado de linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de células B o un neoplasma de células B maduras. Los neoplasmas de células B maduras incluyen, pero no se limitan a linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmático, linfoma de células B de la zona marginal esplénica, leucemia de células pilosas, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal nodal, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, y mieloma de células plasmáticas.

La invención también incluye el tratamiento de un linfoma no hodgkiniano que es un neoplasma de células T. Los ejemplos de neoplasmas de células T incluyen, pero no se limitan a leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica de células T grandes granulares, leucemia de células NK, linfoma de células NK/T extranodal, micosis fungoides, linfoma de células grandes anaplásico cutáneo primario, linfoma de células T de tipo panniculitis subcutáneo, linfoma de células T intestinal de tipo enteropático, linfoma de células T gamma-delta hepatoesplénico, linfoma de células T angioinmunoblástico, linfoma de células T periféricas, linfoma de células grandes anaplásico, y linfoma de células T adultas.

En una realización de la invención, la enfermedad mieloproliferativa o linfoproliferativa es un cáncer. Tal como se emplea en la presente, el término “cáncer”, a menos que se indique lo contrario, se refiere a enfermedades que se caracterizan por un crecimiento y/o una proliferación celular anómalo e incontrolados. Los tipos de cáncer en los que las composiciones son útiles incluyen, pero no se limitan a cánceres asociados con la transformación de células germinales mieloides y/o linfoides.

Tal como se emplea en la presente, el término “clorotoxina”, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un polipéptido de treinta y seis aminoácidos, de longitud completa, derivado en la naturaleza del veneno del escorpión

Leiurus quinquestriatus (DeBin *et al.* (1993), Am. J. Physiol., 264, C361-369), que comprende la secuencia de aminoácidos de la clorotoxina nativa como se indica en SEQ ID NO:1. El término “clorotoxina” incluye polipéptidos que comprenden SEQ ID NO:1 que se han producido de forma sintético o recombinante, como los descritos en la patente de EEUU 6.319.891.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “subunidad de clorotoxina” o “subunidad de la clorotoxina” se refiere a un péptido que comprende menos de treinta y seis aminoácidos contiguos de la clorotoxina y que es capaz de unirse específicamente a células de cáncer.

La clorotoxina y sus derivados peptídicos pueden prepararse utilizando métodos de síntesis peptídica en fase sólida (o en fase de disolución) convencionales, como se conoce en la técnica. Además, los ácidos nucleicos que codifican estos péptidos pueden sintetizarse utilizando instrumentos para la síntesis de oligonucleótidos disponibles en el mercado, y pueden producirse de modo recombinante utilizando sistemas de producción recombinantes convencionales. La producción utilizando una síntesis peptídica en fase sólida es necesaria si se van a incluir aminoácidos no codificados por un gen.

Los fragmentos de la clorotoxina útiles en la invención comprenden la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), que se corresponde con los restos aminoácidos 23 a 29 de SEQ ID NO:1.

En la presente se describen las correspondientes toxinas polipeptídicas de otras especies de escorpiones, también denominadas de modo general en la presente derivados de clorotoxina, que muestran una actividad similar o relacionada con la clorotoxina.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “toxina de escorpión relacionada” se refiere a cualquiera de las toxinas o los péptidos relacionados, como los descritos en la tabla I, que muestran una coincidencia de secuencia de aminoácidos y/o de nucleótidos con la clorotoxina. Los ejemplos de toxinas de escorpión relacionadas incluyen, pero no se limitan a la neurotoxina CT de *Mesobuthus martensii* (GenBank nº de registro AAD47373), la neurotoxina BmK 41-2 de *Buthus martensii karsch* (GenBank nº de registro A59356), la neurotoxina Bm12-b de *Buthus martensii* (GenBank nº de registro AAK16444), la toxina probable LQH 8/6 de *Leiurus quinquestriatus hebraeu* (GenBank nº de registro P55966), la toxina pequeña de *Mesobuthus tamulus indicus* (GenBank nº de registro P15229).

La homología o coincidencia de secuencia al nivel de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos se determina mediante un análisis BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, herramienta de búsqueda de alineaciones básicas) utilizando el algoritmo empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx (Altschul *et al.* (1997), Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402, y Karlin *et al.* (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2264-2268), que se adaptan para la búsqueda de similitudes de secuencia. La estrategia empleada por el programa BLAST consiste en considerar primero segmentos similares, con huecos (no contiguos) y sin huecos (contiguos), entre una secuencia problema y una secuencia de la base de datos, después evaluar la significancia estadística de todos los apareamientos que se identifican y, por último, resumir sólo los apareamientos que cumplen un umbral preseleccionado de significancia. Para un análisis de las cuestiones básicas para la búsqueda de similitudes en bases de datos de secuencias, véase Altschul *et al.* (1994), Nature Genetics, 6, 119-129. Los parámetros de búsqueda para histogramas, descripciones, alineamientos, expectativas (es decir, el umbral de significancia estadística para indicar apareamientos con secuencias de la base de datos), límite de exclusión, matrices y filtros (baja complejidad) se encuentran en los ajustes por defecto. La matriz de puntuación por defecto utilizada por blastp, blastx, tblastn y tblastx es la matriz BLOSUM62 (Henikoff *et al.* (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919), recomendada para secuencias problema con una longitud de más de ochenta y cinco nucleótidos.

Para blastn, la matriz de puntuación se ajusta mediante las proporciones de M (es decir, la puntuación de premio por un par de restos apareados) a N (es decir, la puntuación de penalización por restos no apareados), en los que los valores por defecto para M y N son +5 y -4, respectivamente. Se ajustan cuatro parámetros de blastn como sigue: Q = 10 (penalización de creación de hueco); R = 10 (penalización de extensión de hueco); guiño = 1 (genera impactos de palabra en cada posición de guiño a lo largo de la secuencia problema); y ancho de hueco = 16 (ajusta el ancho de la ventana dentro de la cual se generan los alineamientos con huecos). Los ajustes de los parámetros equivalentes en blastp son Q = 9; R = 2; guiño = 1; y ancho de hueco = 32. Una comparación Bestfit entre las secuencias, disponible en el paquete GCG, versión 10.0, emplea los parámetros de ADN GAP = 50 (penalización de creación de hueco) y LEN = 3 (penalización de extensión de hueco), y los ajustes equivalentes en las comparaciones de proteínas son GAP = 8 y LEN = 2.

No debe considerarse que las proteínas de fusión ni las extensiones C-terminales o N-terminales en la secuencia peptídica afecten a la homología. Los ejemplos de dichas extensiones incluyen, pero no se limitan a las siguientes secuencias:

HHHHHHMCMPCFTTDHQMARCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR (SEQ ID NO:2),

YMCMPCFTTDHQMARCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR (SEQ ID NO:3),

YSYMCMPCFTTDHQMARCDDCCGGKGTGKCYGPQCLCR (SEQ ID NO:4).

ES 2 339 683 T3

Los variantes peptídicos contemplados también incluyen, pero no se limitan a las siguientes secuencias:

MCMPCFTTDHQMARCDDCCGGKGKGRGKCFGPQCLR (SEQ ID NO:5),

5 RCKPCFTTDPQMSKKCADCCGGKGKGGKCYGPQCLC (SEQ ID NO:6),

RCSPCFTTDQQMTKKCYDCCGGKGKGGKCYGPQCICAPY (SEQ ID NO:7).

10 La invención puede utilizarse *in vivo*, normalmente en mamíferos, como seres humanos, ovejas, caballos, ganado vacuno, cerdos, perros, gatos, ratas y ratones, o *in vitro*. La invención es particularmente útil para el tratamiento de sujetos humanos.

15 *Polipéptidos y proteínas recombinantes*

La invención proporciona además el uso de una proteína de clorotoxina recombinante o su fragmento, para el tratamiento de trastornos mieloproliferativos o linfoproliferativos. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la clorotoxina o su fragmento pueden utilizarse para producir de modo recombinante este polipéptido. Estas moléculas de
20 ácidos nucleicos pueden estar en una forma aislada, o pueden estar unidas operablemente a elementos de control de la expresión o a secuencias de vectores. Las células hospedantes pueden contener los vectores mediante transformación, transfección, electroporación o cualquier otro medio reconocido en la técnica para introducir un ácido nucleico en una célula.

25 Tal como se emplea en la presente, un “replicón” es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que actúa como una unidad autónoma de replicación del ADN *in vivo* (es decir, capaz de replicarse bajo su propio control).

30 Tal como se emplea en la presente, un “vector” es un replicón, como un plásmido, un fago o un cósmido, al cual puede estar unido otro segmento de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) para provocar la replicación del segmento unido. Los vectores de la invención incluyen vectores víricos.

Tal como se emplea en la presente, un “ácido nucleico” se refiere a la forma polimérica de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina y/o citosina) en su forma monocatenaria o en una hélice bicatenaria.
35 Esta expresión se refiere sólo a la estructura primaria y secundaria de la molécula y no se limita a ninguna forma terciaria particular. Por tanto, este término incluyen ARN o ADN monocatenario, ADN bicatenario que se encuentra en moléculas de ADN lineales (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. En el análisis de la estructura de moléculas de ADN bicatenario concretas, en la presente las secuencias pueden describirse según la convención normal de ofrecer la secuencia sólo en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita del ADN
40 (por ejemplo, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

Una “secuencia codificadora” del ácido nucleico es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y se traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan por un codón de inicio en el extremo terminal 5' (amino) y un codón de
45 fin de la traducción en el extremo terminal 3' (carboxi). Una señal de poliadenilación y una secuencia de fin de la transcripción estarán normalmente localizadas 3' con respecto a la secuencia codificadora.

Las secuencias de control de la transcripción y de la traducción son secuencias reguladoras del ADN, como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores y similares, que proporcionan la expresión de una
50 secuencia codificadora en una célula hospedante.

Tal como se emplea en la presente, una “secuencia promotora” es una región reguladora del ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora cadena abajo (en dirección 3'). Para objetivos de definición en la presente invención, la secuencia del promotor está unida (globalmente) en su
55 extremo terminal 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende cadena arriba (en dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia del promotor se encontrará un sitio de inicio de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas responsables de la unión de ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo, pero no siempre, contienen cajas “TATA” y cajas “CAT”.

60 Una secuencia codificadora está “bajo el control” de secuencias de control de la transcripción y de la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que entonces se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificadora.

65 Puede incluirse una “secuencia señal” antes de la secuencia codificadora o puede utilizarse una secuencia de péptido señal de una toxina de escorpión. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal con respecto al polipéptido, que se comunica con la célula hospedante para dirigir al polipéptido hacia la superficie celular o para segregar el polipéptido hacia el medio. Este péptido señal es cortado por la célula hospedante antes de que la proteína abandone

la célula. Pueden encontrarse secuencias señal asociadas con una diversidad de proteínas nativas en procariotas y eucariotas. Por ejemplo, el factor alfa, una proteína nativa de levaduras, se segrega desde las levaduras, y su secuencia señal puede unirse a proteínas heterólogas para ser segregadas hacia el medio (véase la patente de EEUU 4.546.082). Además, se ha descubierto que el factor alfa y sus análogos segregan proteínas heterólogas en una diversidad de levaduras, como *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (documento EP 88312306.9; publicación EP 0324274; y documento EP 0301669). Un ejemplo para su uso en células de mamífero es la señal tPA utilizada para expresar la cadena ligera del factor VIIIc.

Una célula ha sido “transformada” por un ácido nucleico exógeno o heterólogo cuando dicho ácido nucleico se ha introducido dentro de la célula. El ácido nucleico transformante puede o no integrarse (unirse covalentemente) en el ADN cromosómico que forma el genoma de la célula. En procariotas, por ejemplo, el ácido nucleico transformante puede mantenerse sobre un elemento episómico, como un plásmido o un vector vírico. Con respecto a células eucariotas, una célula transformada de modo estable es aquella en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma, de forma que es heredado por las células hijas a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones formados por una población de células hijas que contienen el ácido nucleico transformante.

Tal como se emplea en la presente, una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es capaz de un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones. Tal como se emplea en la presente, las secuencias de ácidos nucleicos muestran una “coincidencia sustancial” cuando al menos aproximadamente 85% (preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95%) de los nucleótidos están apareados a lo largo de la longitud definida de las secuencias de nucleótidos. Las secuencias que son sustancialmente idénticas pueden identificarse con un experimento de hibridación Southern, por ejemplo bajo condiciones rigurosas según se definen para este sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la técnica.

Una región “heteróloga” de la construcción del ácido nucleico es un segmento identificable de un ácido nucleico dentro de una molécula de ácido nucleico mayor que no se encuentra en asociación con la molécula mayor en la naturaleza. Por tanto, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen normalmente estará flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico del mamífero en el genoma del organismo de origen. Otro ejemplo de una secuencia codificadora heteróloga es una construcción en la que la secuencia codificadora misma no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc en el que la secuencia codificadora genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo).

Se emplean vectores para simplificar la manipulación de los ácidos nucleicos que codifican la clorotoxina y los polipéptidos derivados de la clorotoxina, para la preparación de grandes cantidades de ácidos nucleicos para su posterior procesamiento (vectores de clonación) o para la expresión de los polipéptidos (vectores de expresión). Los vectores comprenden plásmidos, virus (incluidos fagos), y fragmentos de ADN integrado (es decir, fragmentos que están integrados en el genoma del hospedante mediante recombinación). No es necesario que los vectores de clonación contengan secuencias de control de la expresión. Sin embargo, las secuencias de control en un vector de expresión incluyen secuencias de control de la transcripción y de la traducción, como un promotor de la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión a ribosomas adecuados, y secuencias que controlan el fin de la transcripción y de la traducción. El vector de expresión preferiblemente debería incluir un gen de selección para facilitar la expresión estable del gen de la clorotoxina y/o para identificar células transformadas. Sin embargo, el gen de selección para mantener la expresión puede ser suministrado por un vector diferente en sistemas de cotransformación que emplean células hospedantes eucariotas.

Los vectores adecuados en general contendrán secuencias de replicones (orígenes de la replicación, para su uso en vectores no integrativos) y de control que se derivan de una especie compatible con el hospedante de expresión previsto. La expresión vector “replicable”, tal como se emplea en la presente, pretende incluir vectores que contengan estos replicones, así como vectores que son replicados mediante la integración en el genoma del hospedante. Las células hospedantes transformadas son células que se han transformado o transfectado con vectores que contienen un ácido nucleico que codifica la clorotoxina o un polipéptido derivado de la clorotoxina. Los polipéptidos expresados pueden segregarse hacia el sobrenadante del cultivo, bajo el control de señales de procesamiento adecuadas en el péptido expresado (por ejemplo, secuencias señal homólogas o heterólogas).

Los vectores de expresión para las células hospedantes normalmente contienen un origen de la replicación, un promotor colocado cadena arriba de la secuencia codificadora de la clorotoxina o del polipéptido derivado de la clorotoxina, junto con un sitio de unión a ribosomas, un sitio de poliadenilación, y una secuencia de fin de la transcripción. Los expertos en la técnica apreciarán que ciertas de estas secuencias no son necesarias para la expresión en ciertos hospedantes. Un vector de expresión para ser utilizado con microbios sólo necesita contener un origen de la replicación reconocido por el hospedante, un promotor que actúe en el hospedante, y un gen de selección.

Los promotores que se emplean habitualmente se derivan de polioma, virus del papiloma bovino, CMV (citomegalovirus murino o humano), virus del sarcoma de Rouse, adenovirus, y virus de simio 40 (SV40). También pueden utilizarse otras secuencias de control (por ejemplo, secuencias de terminadores, poliA, potenciadores o de amplificación).

Se construye un vector de expresión de modo que la secuencia codificadora de la clorotoxina o del polipéptido derivado de la clorotoxina se localice en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo la colocación y la orientación de la secuencia codificadora con respecto a las secuencias de control de tal forma que la secuencia codificadora se transcribe y se traduce bajo el "control" de las secuencias de control (es decir, la ARN polimerasa que se une a la molécula de ADN en las secuencias de control transcribe la secuencia codificadora). Las secuencias de control pueden estar acopladas a la secuencia codificadora antes de la inserción en un vector, como los vectores de clonación descritos anteriormente. Como alternativa, la secuencia codificadora puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado. Si la célula hospedante seleccionada es una célula de mamífero, las secuencias de control pueden ser heterólogas u homólogas con la secuencia codificadora de la clorotoxina o del polipéptido derivado de la clorotoxina, y la secuencia codificadora puede ser ADN genómico que contiene intrones o ADNc.

Pueden utilizarse cultivos de células de eucariotas superiores para expresar las proteínas de la presente invención, tanto células de vertebrados como de invertebrados, incluyendo insectos, y los procedimientos para su propagación son conocidos.

Otros vectores de expresión son aquellos que se emplean en sistemas eucariotas. Un ejemplo de un sistema de expresión eucariota es aquel que emplea virus de vaccinia, que es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 86/07593). Los vectores de expresión de levaduras son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU 4.446.235 y 4.430.428). Otro sistema de expresión es el vector pHSI, que transforma a células de ovario de hámster chino (véase el documento WO 87/02062). El tejido de mamífero puede cotransformarse con un ADN que codifique un marcador seleccionable, como la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la timidina quinasa, y un ADN que codifica la clorotoxina o un polipéptido derivado de la clorotoxina. Si se emplea el gen DHFR de tipo salvaje es preferible seleccionar una célula hospedante que sea deficiente en DHFR, permitiendo con ello el uso de la secuencia codificadora de DHFR como marcador para una transfección satisfactoria en medio hgt, que carece de hipoxantina, glicina y timidina.

Dependiendo del sistema de expresión y del hospedante seleccionados, la clorotoxina o el polipéptido derivado de la clorotoxina se producen cultivando las células hospedantes transformadas por una construcción de ADN exógena o heteróloga, como un vector de expresión descrito anteriormente, bajo condiciones en las que se expresa el polipéptido. Entonces la clorotoxina o el polipéptido derivado de la clorotoxina se aísla de las células hospedantes y se purifica. Si el sistema de expresión segrega la proteína o el péptido hacia el medio de crecimiento, la proteína puede purificarse directamente a partir del medio exento de células. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas y de los métodos de recuperación brutos iniciales está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

Cuando se ha preparado o aislado una secuencia codificadora de una clorotoxina o de un polipéptido de un fragmento de la clorotoxina de la invención, puede clonarse en cualquier vector apropiado y, por tanto, mantenerse en una composición de células que está sustancialmente exenta de células que no contienen ninguna secuencia codificadora de la clorotoxina. Como se describió anteriormente, los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas en la presente invención pueden administrarse por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intracraneal, transdérmica o bucal. Por ejemplo, un agente puede administrarse de modo local a un tumor mediante microinfusión. Como alternativa, o al mismo tiempo, la administración puede realizarse por vía oral. La dosificación administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si existe, la frecuencia del tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado.

Puesto que las necesidades de los individuos varían, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de cada componente está dentro de la técnica. Las dosificaciones de la clorotoxina y/o sus fragmentos de la presente invención de forma típica comprenden de aproximadamente 1,0 ng/kg de peso corporal a aproximadamente 0,13 mg/kg de peso corporal. En una realización, las dosificaciones de la clorotoxina y/o sus fragmentos comprenden de aproximadamente 1,0 ng/kg de peso corporal a aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal. En una realización preferida, las dosificaciones para la administración sistémica comprenden de aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal. En otra realización, la dosificación de la clorotoxina y/o sus fragmentos comprende menos de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones más preferidas para la administración sistémica comprenden de aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal. En otra realización preferida, la dosificación de la clorotoxina y/o sus fragmentos comprende menos de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones más preferidas para la administración sistémica comprenden entre aproximadamente 1,0 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal. En otras realizaciones, la cantidad de clorotoxina y/o sus fragmentos administrada es una cantidad eficaz para lograr que la concentración de la clorotoxina y/o sus fragmentos en el suero sea una concentración de aproximadamente 20,0, 10,0, 5,0, 2,50, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,156, 0,078, 0,039, 0,020, 0,010, 0,005, 0,003, 0,0015, 0,0008, 0,0003 ó 0,0001 nM. Las dosificaciones preferidas para la administración directa a un sitio mediante microinfusión comprenden de 1 ng/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal.

Además de la clorotoxina y/o sus fragmentos, las composiciones de la presente invención pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los

compuestos activos para producir preparaciones que puedan utilizarse farmacéuticamente para ser administradas al sitio de acción. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en una forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. También pueden utilizarse liposomas para encapsular el agente para la administración hacia la célula.

La formulación farmacéutica para la administración sistémica según la invención puede formularse para la administración entérica, parenteral o tópica. En efecto, estos tres tipos de formulaciones pueden utilizarse simultáneamente para lograr la administración sistémica del ingrediente activo.

Como se mencionó anteriormente, puede emplearse la administración tópica. Puede utilizarse cualquier formulación tópica habitual, como una disolución, una suspensión, un gel, un ungüento o un bálsamo y similares. La preparación de estas formulaciones tópicas se describen en la técnica de las formulaciones farmacéuticas como se ejemplifica, por ejemplo, en Gennaro *et al.* (1995), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing. Para la aplicación tópica, las composiciones también pueden administrarse como un polvo o un pulverizado, en particular en forma de aerosol. En algunas realizaciones, las composiciones de esta invención pueden administrarse mediante inhalación. Para la terapia con inhalación, los ingredientes activos pueden estar en una disolución útil para la administración mediante inhaladores dosimétricos o en una forma adecuada para un inhalador de polvo seco. En otra realización, las composiciones son adecuadas para la administración mediante lavado bronquial.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen cápsulas de gelatina dura o blanda, píldoras, comprimidos, incluyendo comprimidos revestidos, elixires, suspensiones, jarabes o inhalaciones y sus formas de liberación controlada.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "clorotoxina o su fragmento" también incluye sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, clatratos, polimorfos y profármacos. Según la invención, las estructuras químicas mostradas en la presente y, por tanto, los polipéptidos útiles en la invención, incluyen todos los correspondientes enantiómeros y estereoisómeros, es decir, la forma estereoméricamente pura (por ejemplo, geoméricamente pura, enantioméricamente pura o diastereoméricamente pura) y las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas. Las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas pueden resolverse en sus enantiómeros o estereoisómeros componentes mediante métodos muy conocidos, como cromatografía de gases en fase quiral, cromatografía líquida de alta resolución en fase quiral, cristalización del compuesto como un complejo de sal quiral, o cristalización del compuesto en un disolvente quiral.

Los enantiómeros y los estereoisómeros también pueden obtenerse a partir de intermedios, reactivos y catalizadores estereomérica o enantioméricamente puros mediante métodos sintéticos asimétricos muy conocidos.

La invención incluye la clorotoxina, sus fragmentos o sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, hidratos, clatratos, polimorfos y profármacos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o listado en la farmacopea de EEUU u otra farmacopea reconocida de modo general para su uso en animales, y más en concreto en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, un adyuvante, un excipiente o un vehículo con el que se administra un compuesto de la invención. Estos vehículos farmacéuticos pueden ser, por ejemplo, líquidos, como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser disolución salina, metilcelulosa, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además pueden utilizarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administran a un paciente, las composiciones de la invención y los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. El agua es un vehículo preferido cuando la composición de la invención se administra por vía intravenosa. Las disoluciones salinas y las disoluciones de dextrosa y glicerol acuosas también pueden emplearse como vehículos líquidos, en particular para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes, como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH.

Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en las composiciones. Los polipéptidos incluidos en las presentes composiciones que son básicos en la naturaleza son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que pueden utilizarse para preparar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición de ácidos no tóxicas (es decir, sales que contienen aniones farmacéuticamente aceptables) incluyendo,

pero sin limitarse a sales del ácido sulfúrico, cítrico, maleico, acético, oxálico, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metansulfonato, etansulfonato, bencensulfonato, p-toluensulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Los polipéptidos incluidos en las composiciones utilizadas en los métodos de la invención que son ácidos en la naturaleza son capaces de formar sales básicas con diversos cationes farmacológicamente aceptables. Los ejemplos de estas sales incluyen sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo y, en particular, sales de calcio, magnesio, sodio, litio, cinc, potasio y hierro.

10 Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión “solvato farmacéuticamente aceptable” significa un polipéptido de clorotoxina o su derivado que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de un disolvente unido mediante fuerzas intermoleculares no covalentes. Los disolventes preferidos son volátiles, no tóxicos y/o aceptables para la administración a seres humanos en cantidades traza.

15 Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión “hidrato farmacéuticamente aceptable” significa un polipéptido de clorotoxina o su derivado que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida mediante fuerzas intermoleculares no covalentes.

20 Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión “clatrato farmacéuticamente aceptable” significa un polipéptido de clorotoxina o su derivado que está en forma de un látice cristalino que contiene espacios (por ejemplo, canales) que tienen una molécula huésped (por ejemplo, un disolvente o agua) atrapada en su interior.

25 Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión “polimorfo farmacéuticamente aceptable” significa un polipéptido de clorotoxina o su derivado que existe en varias formas diferenciadas (por ejemplo, cristalina, amorfa). La invención incluye todas estas formas. Los polimorfos son, por definición, cristales de la misma molécula que tienen diferentes propiedades físicas como resultado del orden de las moléculas en el látice cristalino. Las diferencias en las propiedades físicas que muestran los polimorfos afectan a parámetros farmacéuticos como la estabilidad en la conservación, la compresibilidad y la densidad (que es importante en la formulación y la fabricación del producto), y las velocidades de disolución (que es un factor importante para determinar la biodisponibilidad). Las diferencias en la estabilidad pueden surgir de cambios en la reactividad química (por ejemplo, una oxidación diferencial, de manera que la forma de dosificación se decolora con más rapidez cuando está formada por un polimorfo que cuando está formada por otro polimorfo) o cambios mecánicos (por ejemplo, los comprimidos se disgregan cuando se conservan a medida que un polimorfo cinéticamente favorecido se convierte en un polimorfo más termodinámicamente estable) o ambos (por ejemplo, los comprimidos de un polimorfo son más susceptibles a la desintegración cuando la humedad es alta). Como resultado de las diferencias de solubilidad/disolución, en el caso extremo algunas transiciones polimórficas pueden producir una falta de potencia o, en el otro extremo, toxicidad. Además, las propiedades físicas del cristal pueden ser importantes en el procesamiento: por ejemplo, un polimorfo puede ser más proclive a formar solvatos o puede ser difícil de filtrar y de eliminar sus impurezas mediante lavados (es decir, la forma y la distribución del tamaño de las partículas puede ser diferente entre un polimorfo con respecto a otro).

30 Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión “profármaco farmacéuticamente aceptable” significa un derivado de un compuesto que puede hidrolizarse, oxidarse o reaccionar de otro modo bajo condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar el compuesto. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a compuestos que comprenden restos biohidrolizables, como análogos de amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, y fosfatos biohidrolizables. Otros ejemplos de profármacos incluyen compuestos que comprenden oligonucleótidos, péptidos, lípidos, grupos alifáticos y aromáticos, o restos NO, ONO, NO₂ y ONO₂. Los profármacos pueden prepararse de forma típica utilizando métodos muy conocidos, como los descritos en Bungeard (19859, Design of Prodrugs, Elsevier Press).

35 Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, las expresiones “amida biohidrolizable”, “éster biohidrolizable”, “carbamato biohidrolizable”, “carbonato biohidrolizable”, “ureido biohidrolizable”, o “fosfato biohidrolizable” significa una amida, un éster, un carbamato, un carbonato, un ureido o un fosfato, respectivamente, de un compuesto que: (1) no interfiere con la actividad biológica del compuesto pero que puede conferir a ese compuesto propiedades ventajosas *in vivo*, como captación, duración de la acción, o aparición de la acción; o (2) es biológicamente inactivo pero se convierte *in vivo* en el compuesto biológicamente activo. Los ejemplos de ésteres biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a ésteres de alquilo inferior, ésteres de aciloxialquilo inferior (como ésteres de acetoxilmetilo, acetoxietilo, aminocarboniloximetilo, pivaloiloximetilo y pivaloiloxietilo), ésteres de lactonilo (como ésteres de ftalidilo y tioftalidilo), ésteres de alcoxiaciloxialquilo inferior (como ésteres de metoxycarboniloximetilo, etoxycarboniloxietilo e isopropoxycarboniloxietilo), ésteres de alcoxiacilquilo, ésteres de colina, y ésteres de acilaminoalquilo (como ésteres de acetamidometilo). Los ejemplos de amidas biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a amidas de alquilo inferior, amidas de aminoácidos, amidas de alcoxiacilo y amidas de alquilaminoalquilcarbonilo. Los ejemplos de carbamatos biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a alquilaminas inferiores, etilendiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas, y poliéteraminas.

65 Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión “terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un polipéptido de la clorotoxina, o su derivado o su sal farmacéuticamente aceptable, solvato,

hidrato, clatrato, polimorfo o profármaco, capaz de provocar una mejoría de una enfermedad o trastorno, o al menos un síntoma discernible de éstos. “Terapéuticamente eficaz” también se refiere a una cantidad que produce una mejoría de al menos un parámetro físico mensurable, no necesariamente discernible por el paciente. En otra realización, la expresión “terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que inhibe el avance de una enfermedad o trastorno, de manera física (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológica (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico) o ambas. En otra realización, la expresión “terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que produce una aparición retrasada de una enfermedad o trastorno.

Tal como se emplea en la presente y a menos que se indique lo contrario, la expresión “profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un polipéptido de la clorotoxina, o su derivado o su sal farmacéuticamente aceptable, solvato, hidrato, clatrato, polimorfo o profármaco, que provoca una reducción del riesgo de adquirir una enfermedad o un trastorno concretos. En una realización, las composiciones se administran como una medida preventiva a un animal, preferiblemente un ser humano, que tenga una predisposición genética a un trastorno descrito en la presente. En otra realización de la invención, las composiciones se administran como una medida preventiva a un paciente que tenga una predisposición no genética a un trastorno descrito en la presente. Por consiguiente, las composiciones de la invención pueden utilizarse para la prevención de una enfermedad o trastorno y al mismo tiempo tratar otro.

La invención también incluye el uso de la clorotoxina y de fragmentos de la clorotoxina marcados isotópicamente que tienen uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o del número másico que normalmente se encuentra en la naturaleza, o uno o más de estos átomos están unidos a los derivados de la clorotoxina. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse incluyen, pero no se limitan a isótopos del hidrógeno, carbono, fósforo, yodo, renio, indio, itrio, tecnecio y lutecio (es decir, que incluyen, pero no se limitan a ^3H , ^{14}C , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{187}Re , ^{64}Cu , ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu), otros isótopos de estos elementos y otros isótopos conocidos en la técnica. La clorotoxina, los fragmentos de la clorotoxina, sus profármacos y las sales farmacéuticamente aceptables marcados que contienen los isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos pueden utilizarse para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas o linfoproliferativas. Los isótopos tritio y carbono-14 son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y su detectabilidad. Además, una sustitución por isótopos más pesados, como el deuterio, puede producir ciertas ventajas terapéuticas que surgen de su mayor estabilidad metabólica, por ejemplo una mayor semivida *in vivo* o unos requerimientos de dosificación menores y, por tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias.

Proteínas de fusión

Cuando la presente invención se refiere al tratamiento, un agente citotóxico se une a la clorotoxina. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a gelonina, ricina, saponina, exotoxina de pseudomonas, proteína antivírica de la hierba carmén, toxina de la difteria, proteínas del complemento o cualquier otro agente conocido en la técnica que sea capaz de matar una célula tras ponerse en contacto con dicha célula.

Cuando la presente invención se refiere al diagnóstico, la clorotoxina puede estar unida al menos a un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido incluye un dominio de unión que se une específicamente a un epitopo expresado sólo sobre células mieloides y/o linfoides que muestran un crecimiento anómalo (es decir, células de cáncer). Estos dominios de unión tienen una secuencia de aminoácidos capaz de unirse o de asociarse específicamente de otro modo con una célula mieloides y/o linfoides que muestre un crecimiento anómalo (por ejemplo, células de cáncer benigno y maligno). En algunas realizaciones, el dominio de unión es un anticuerpo, mientras que en otras realizaciones es un ligando que se une específicamente con un receptor expresado sólo sobre estas células. Los ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos que se unen específicamente a células B o a células T. Los ejemplos de ligandos de receptores incluyen, pero no se limitan a citoquinas y factores del crecimiento, incluyendo el factor del crecimiento epidérmico.

El segundo polipéptido también puede incluir un dominio de estabilización que aumente la semivida *in vitro* e *in vivo* del polipéptido de fusión. Tal como se emplea en la presente, la expresión “dominio de estabilización” se refiere a una secuencia de aminoácidos capaz de extender la semivida *in vitro* e *in vivo* de la clorotoxina o de un derivado de la clorotoxina cuando se compara con la clorotoxina sola. El dominio de estabilización puede comprender proteínas humanas (por ejemplo, de longitud completa o truncadas, proteínas solubles de fragmentos extracelulares, etc.), como la albúmina de suero humana u otras proteínas que estabilizan la semivida *in vivo* e *in vitro* de la clorotoxina o de un derivado de la clorotoxina. Estos dominios funcionales adicionales pueden actuar ellos mismos como péptidos conectores, por ejemplo para unir un dominio de unión a una célula de cáncer con la clorotoxina o con el derivado de la clorotoxina. Como alternativa, pueden colocarse en otra parte de la molécula de fusión (por ejemplo, en su extremo amino- o carboxi-terminal). En realizaciones alternativas, el dominio de estabilización es un resto químico (por ejemplo, PEG (polietilenglicol) o un dextrano).

El término “fusionado” o la expresión “polipéptido de fusión”, tal como se emplean en la presente, se refieren a polipéptidos en que: (i) un dominio funcional dado (es decir, un dominio de unión a células de cáncer) está unido en su extremo carboxi-terminal mediante un enlace covalente al extremo amino-terminal de otro dominio funcional (es decir, un componente de la albúmina del suero humana) o a un péptido conector que en sí mismo está unido mediante un enlace covalente con el extremo amino-terminal de la clorotoxina o del derivado de la clorotoxina; o (ii) un dominio funcional dado (es decir, un dominio de unión a la clorotoxina) está unido en su extremo amino-terminal mediante

un enlace covalente al extremo carboxi-terminal de otro dominio funcional (es decir, un componente de la albúmina del suero humana) o a un péptido conector que en sí mismo está unido mediante un enlace covalente con el extremo carboxi-terminal de la clorotoxina o del derivado de la clorotoxina.

- 5 De forma similar, “condensado” cuando se emplea en conexión con los intermedios de ácidos nucleicos significa que el extremo 3’- o 5’-terminal de una secuencia de nucleótidos que codifica un primer dominio funcional está unido al respectivo extremo 3’- o 5’-terminal de una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo dominio funcional, mediante un enlace covalente o de modo indirecto mediante un conector peptídico que, en sí mismo, está unido covalentemente preferiblemente en sus extremos terminales con el polinucleótido que codifica el primer dominio
10 funcional y, opcionalmente, un ácido nucleico que codifica el segundo dominio funcional.

Los ejemplos de polipéptidos de fusión puede ser representados por las siguientes fórmulas, pero no se limitan a éstas:

15	R1-L-R2	(i)
	R2-L-R1	(ii)
	R1-L-R2-L-R1	(iii)
20	R1-L-R1-L-R2	(iv)
	R2-L-R1-L-R1	(iv)

- 25 en las que R1 es la secuencia de aminoácidos de un dominio que se une específicamente a una célula de cáncer mielóide y/o linfóide o es un dominio de transporte, por ejemplo un dominio que permite la entrada del polipéptido a través de la barrera hematoencefálica, R2 es la secuencia de aminoácidos de un dominio de estabilización (por ejemplo, albúmina de suero humana), cada L es una clorotoxina o un derivado de la clorotoxina que está unido mediante un enlace covalente a un extremo terminal de R1 y/o R2, por lo cual los fragmentos de moléculas anteriores se leen de
30 manera direccional (es decir, la parte de la izquierda se corresponde con el amino-terminal y la parte de la derecha con el carboxi-terminal de la molécula).

Diagnóstico utilizando la clorotoxina y/o sus fragmentos

- 35 En la práctica del diagnóstico según esta invención, la clorotoxina y/o sus derivados pueden utilizarse por sí solos o en combinación con otros ingredientes inactivos. Como se analizó anteriormente, la presente invención incluye composiciones y métodos en los que un marcador está unido a la clorotoxina o su derivado. Por tanto, la invención incluye la administración de la clorotoxina marcada o su derivado marcado para el diagnóstico de una enfermedad
40 asociada con el crecimiento anómalo de células mieloides o linfoides, incluyendo el cáncer.

La invención puede utilizarse *in vivo*, normalmente en mamíferos, como seres humanos, ovejas, caballos, cerdos, perros, gatos, ratas y ratones, o *in vitro*. La invención es particularmente útil en el diagnóstico de sujetos humanos.

- 45 Sin más descripción, se cree que los expertos en la técnica, utilizando la anterior descripción y los siguientes ejemplos ilustrativos, pueden fabricar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo describen realizaciones de la presente invención, y no deben considerarse limitantes de ninguna manera del resto de la descripción.

50 Ejemplo 1

- Se utilizaron células Raji (Epstein *et al.* (1966), J. Natl. Cancer Inst., 37, 547-559) y Daudi (Klein *et al.* (1968), Cancer Res., 28, 1300-1310) no fijadas o fijadas con glutaraldehído al 1%. La línea celular Raji (ATCC CCL-86) es
55 una línea celular de linfocitos B derivada de un linfoma de Burkitt de un niño de once años de raza negra. La línea celular Daudi (ATCC CCL-213) es una línea celular de linfoblastos B derivada de un adolescente de dieciséis años de raza negra. Las células se incubaron con clorotoxina o con el péptido del dominio de unión designado (SEQ ID NO:8 ó 10), se lavaron y después se incubaron con estreptavidina-fluoresceína (strp-FL). Tras otro lavado, las células se analizaron utilizando un analizador FACS y se determinó el porcentaje de células con tinción positiva (figura 1). Los
60 controles incluyeron células no tratadas, células incubadas sólo con estreptavidina-fluoresceína, y células incubadas con péptido negativo.

Ejemplo 2

- 65 Se utilizaron células Molt-4 (Minowada *et al.* (1972), J. Natl. Cancer Inst., 49, 891-895) no fijadas o fijadas con glutaraldehído al 1%. La línea celular Molt-4 es una línea celular de linfoblastos T derivada de un paciente en recaída. Las células se incubaron con clorotoxina o con el péptido del dominio de unión designado (SEQ ID NO:8 ó 10), se

ES 2 339 683 T3

lavarón y después se incubaron con estreptavidina-fluoresceína (strp-FL). Tras otro lavado, las células se analizaron utilizando un analizador FACS y se determinó el porcentaje de células con tinción positiva (figura 2). Los controles incluyeron células no tratadas, células incubadas sólo con estreptavidina-fluoresceína, y células incubadas con péptido negativo.

Ejemplo 3

Se optimizó un método de cultivo de tejidos para ensayar los efectos de la clorotoxina (TM-601) en presencia o en ausencia de doxorrubicina en líneas celulares Raji (figura 3) y Daudi (figura 4). Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de microvaloración de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 1000-2000 células por pocillo, dependiendo de la línea celular específica. Se dejó que las células se adhirieran durante 24 horas en un incubador de cultivos celulares humidificado a 37°C suministrado con dióxido de carbono al 5%. Para lograr una curva de dosis-respuesta para cada fármaco en cada línea celular, las células se trataron con concentraciones decrecientes de doxorrubicina durante dos a cinco días. Tras el tratamiento, se cuantificó el efecto citotóxico de la doxorrubicina utilizando el kit de recuento de células-8 ("Cell Counting Kit-8", CCK-8) (Dojindo Inc.) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras el periodo de tratamiento con doxorrubicina, las células se incubaron con reactivo CCK-8 y se incubaron a 37°C durante una a cuatro horas, dependiendo del tipo celular específico. Después de la incubación, las placas se leyeron con un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), para su uso en el diagnóstico de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero, en la que la composición se administra al mamífero, y la detección de la unión de la composición en el mamífero indica la presencia de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en el mamífero.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que la clorotoxina o su fragmento está unido a un segundo polipéptido.

3. La composición de la reivindicación 2, en la que el segundo polipéptido es un anticuerpo o su fragmento que se une específicamente con un epítopo expresado sólo por una célula de cáncer mieloide o linfoide.

4. La composición de la reivindicación 2, en la que el segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polihistidina y albúmina de suero humana.

5. Una composición que comprende una clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), para su uso en el tratamiento de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero, en la que la clorotoxina o su fragmento está unido a un agente citotóxico.

6. La composición de la reivindicación 5, en la que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en gelonina, ricina, saponina, exotoxina de pseudomonas, proteína antivírica de la hierba carmín, toxina de la difteria y proteínas del complemento.

7. La composición de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en la que el mamífero es un ser humano y en la que la cantidad de clorotoxina administrable comprende entre 0,01 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal y 2,0 mg/kg de peso corporal.

8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el trastorno linfoproliferativo es un linfoma no hodgkiniano.

9. La composición de la reivindicación 8, en la que el linfoma no hodgkiniano es un neoplasma de células B o un neoplasma de células T.

10. La composición de la reivindicación 9, en la que el neoplasma de células B es un linfoma/leucemia linfoblástica de precursores de células B o un neoplasma de células B maduras.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que el neoplasma de células B maduras se selecciona del grupo que consiste en linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células B de la zona marginal esplénica, leucemia de células pilosas, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal nodal, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, y mieloma de células plasmáticas.

12. La composición de la reivindicación 9, en la que el neoplasma de células T se selecciona del grupo que consiste en leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica de células T grandes granulares, leucemia de células NK, linfoma de células NK/T extranodal, micosis fungoides, linfoma de células grandes anaplásico cutáneo primario, linfoma de células T de tipo panniculitis subcutáneo, linfoma de células T intestinal de tipo enteropático, linfoma de células T gamma-delta hepatoesplénico, linfoma de células T angioinmunoblástico, linfoma de células T periféricas, linfoma de células grandes anaplásico, y linfoma de células T adultas.

13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el mamífero es un ser humano.

14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el trastorno mieloproliferativo se selecciona del grupo que consiste en policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), metaplasia mieloide agnógena (AMM), también denominada mielofibrosis idiopática (IMF), y leucemia mielógena crónica (CML).

15. La composición de la reivindicación 1, en la que la clorotoxina o su fragmento están marcados.

16. La composición de la reivindicación 15, en la que el marcador es ^{131}I .

17. Un método para detectar la presencia de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica aislada a partir del mamífero, con una composición que comprende una clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), y

ES 2 339 683 T3

(b) detectar la unión de la composición a la muestra, en el que la unión indica la presencia de un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en el mamífero.

5 18. El método de la reivindicación 17, modificado por las características de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, y 8 a 16.

10 19. El uso de una composición que comprende una clorotoxina (SEQ ID NO:1) o su fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos KGRGKSY (SEQ ID NO:8), para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno linfoproliferativo o mieloproliferativo en un mamífero, en la que la clorotoxina o su fragmento está unido a un agente citotóxico.

15 20. El uso de la reivindicación 19, modificado por las características de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

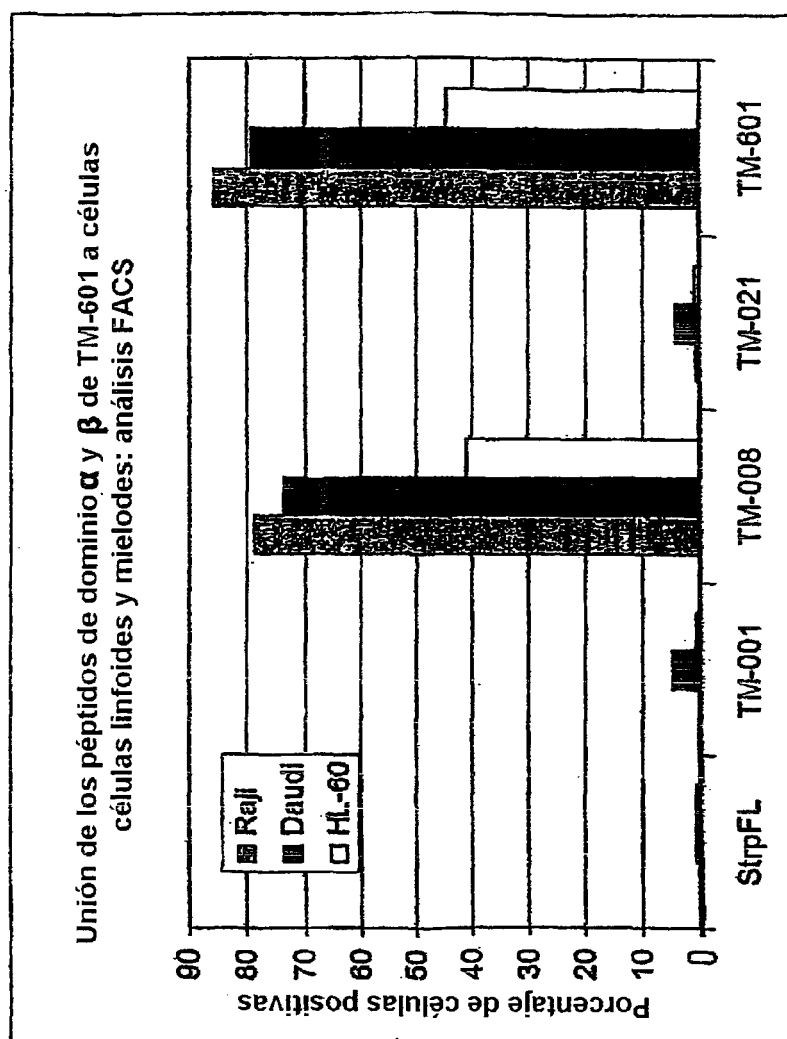


Figura 2

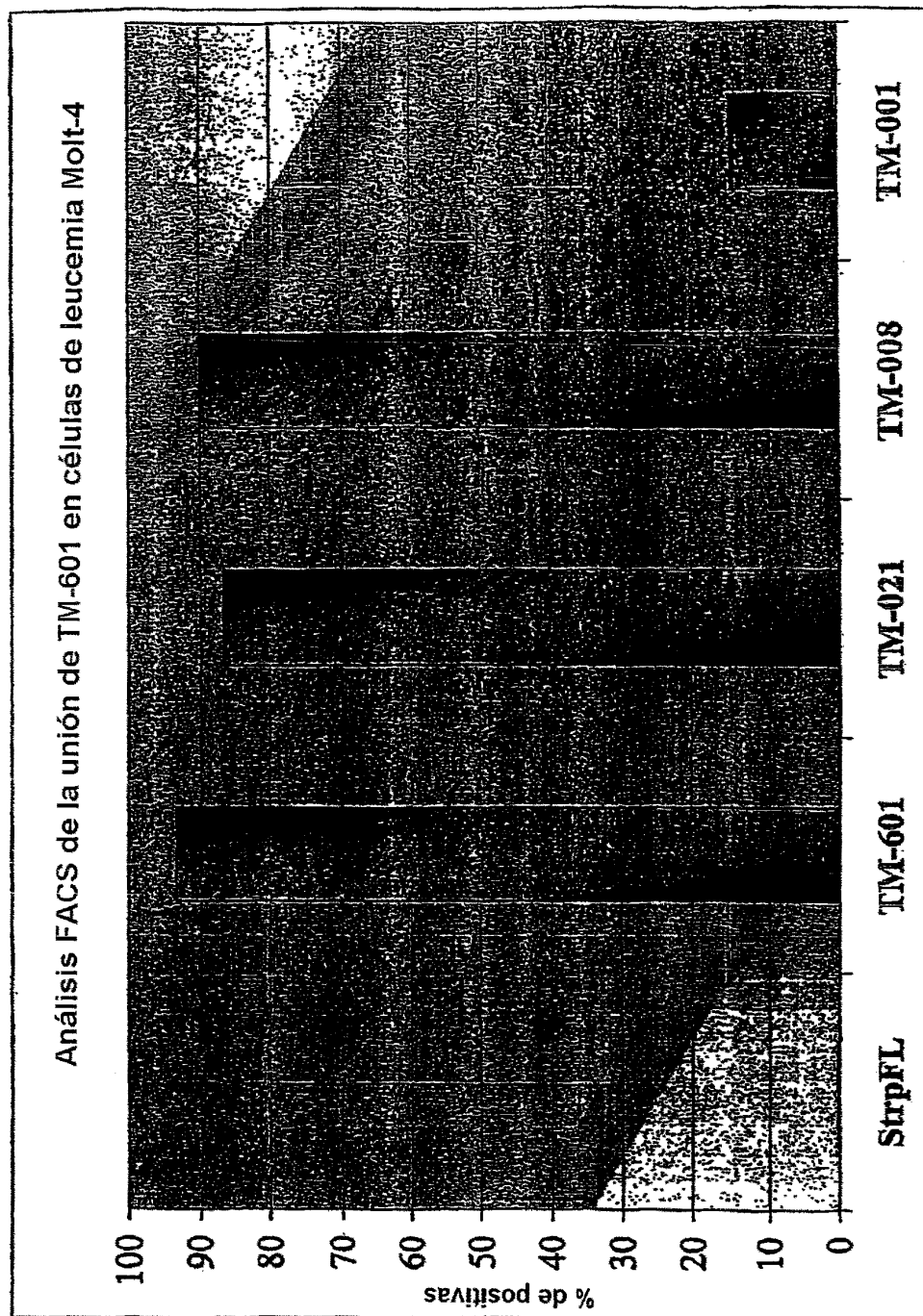


Figura 3

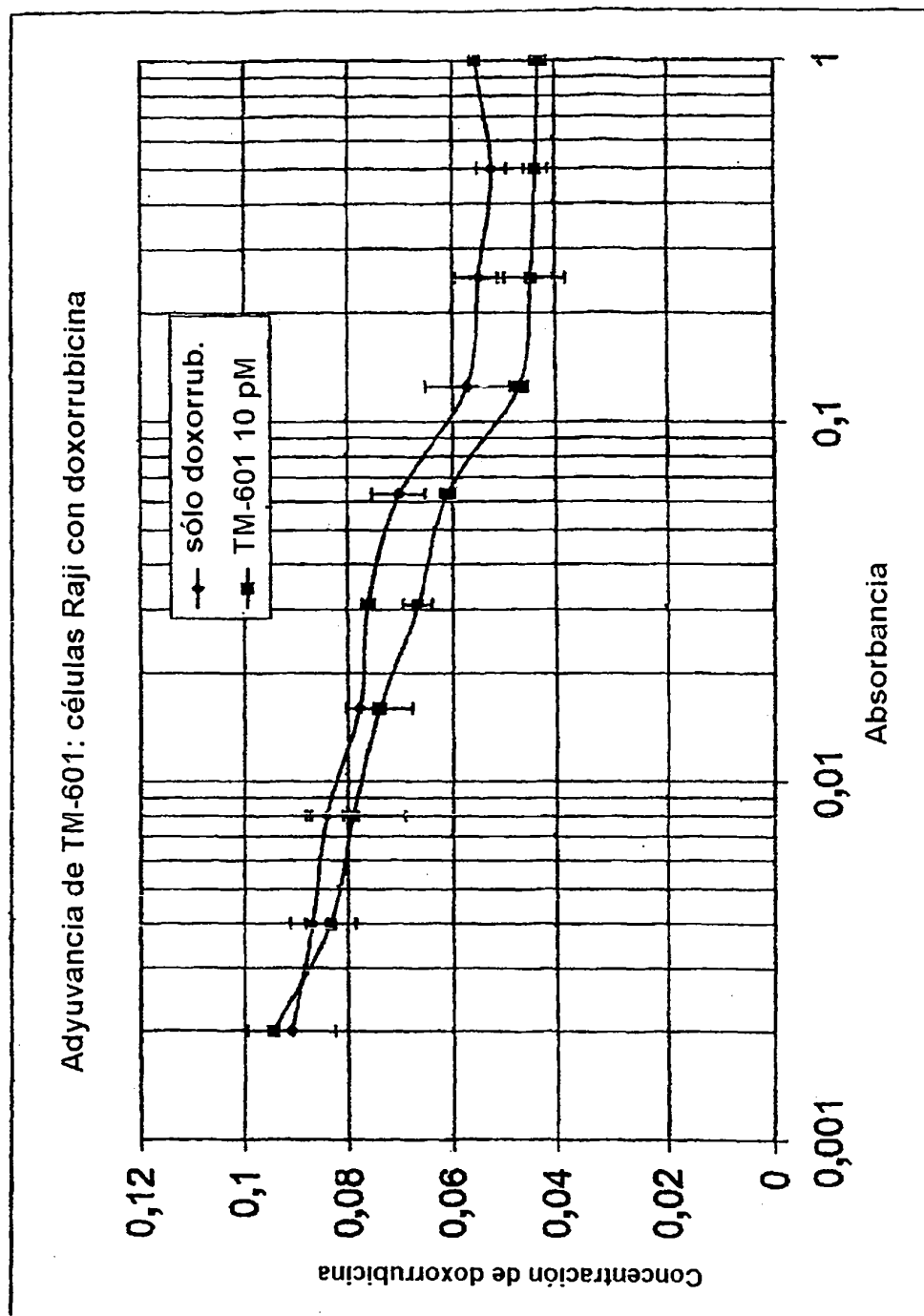
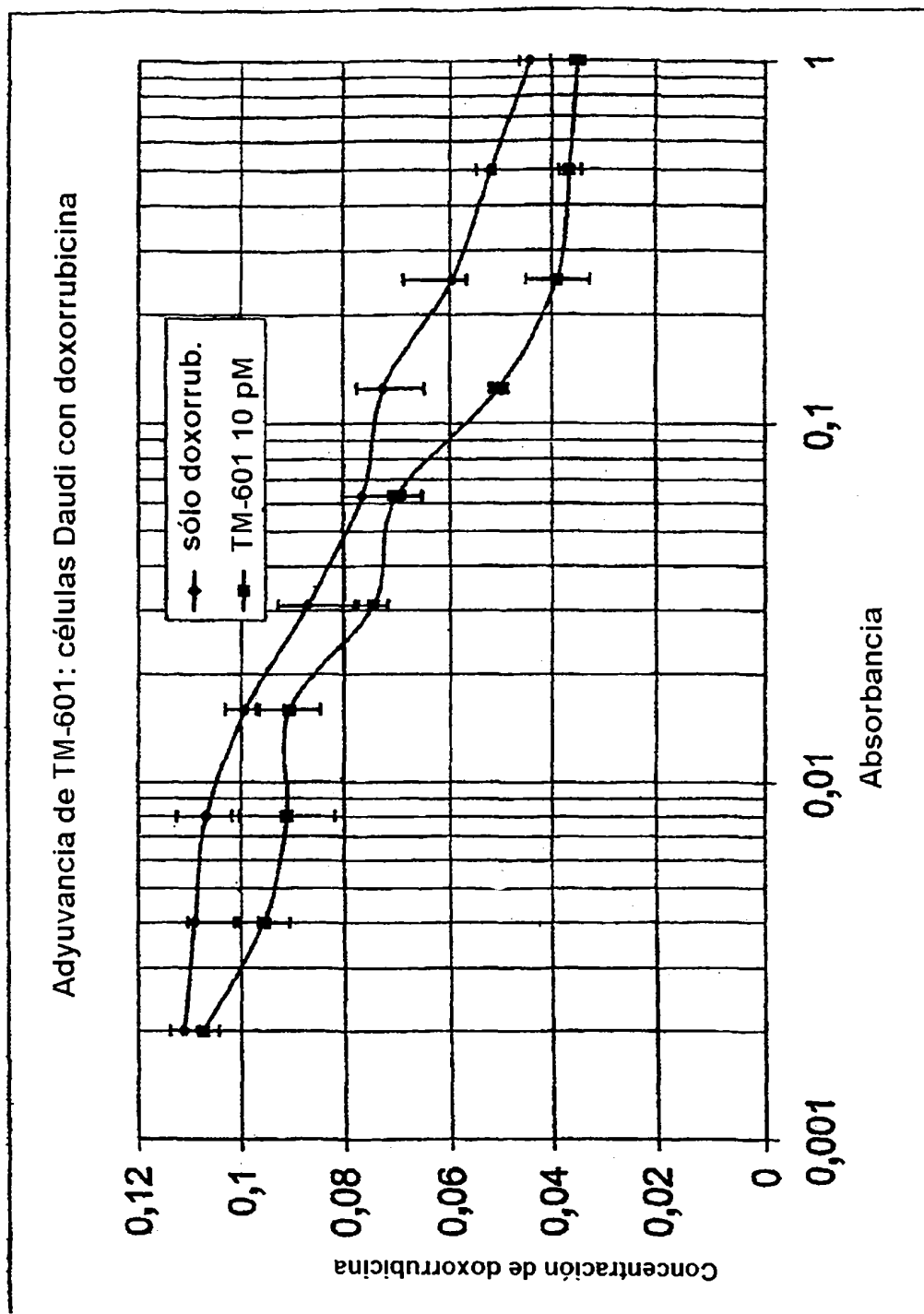


Figura 4



ES 2 339 683 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Vernon, *et al.*

5 <120> Diagnóstico y Tratamiento de Cánceres de Células Mieloides y Linfoides

<130> 2006636-0079

10 <140> PCT/US2005/011523

<141> 2005-04-06

<150> 60/559.433

15 <151> 2004-04-06

<160> 34

20 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 36

25 <212> PRT

<213> *Leiurus quinquestriatus*

<220>

30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Clorotoxina

35 <400> 1

Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Cys
1 5 10 15

40 Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Cys Tyr Gly Pro Gln
20 25 30

45 Cys Leu Cys Arg
35

<210> 2

50 <211> 42

<212> PRT

<213> *Leiurus quinquestriatus*

55 <400> 2

His His His His His His Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His
1 5 10 15

60 Gln Met Ala Arg Lys Cys Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly
20 25 30

65 Lys Cys Tyr Gly Pro Gln Cys Leu Cys Arg
35 40

ES 2 339 683 T3

<210> 3
 <211> 37
 <212> PRT
 5 <213> *Leiurus quinquestriatus*
 <400> 3
 10 Tyr Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 15 Cys Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Cys Tyr Gly Pro
 20 25 30
 20 Gln Cys Leu Cys Arg
 35
 <210> 4
 <211> 39
 <212> PRT
 25 <213> *Leiurus quinquestriatus*
 <400> 4
 30 Tyr Ser Tyr Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala
 1 5 10 15
 35 Arg Lys Cys Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Cys Tyr
 20 25 30
 40 Gly Pro Gln Cys Leu Cys Arg
 35
 <210> 5
 <211> 36
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> variante de la clorotoxina
 <400> 5
 55 Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Cys
 1 5 10 15
 60 Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Cys Phe Gly Pro Gln
 20 25 30
 65 Cys Leu Cys Arg
 35
 <210> 6
 <211> 35

ES 2 339 683 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 $\langle 220 \rangle$

<223> Variante de la clorotoxina

<400> 6

10 Arg Cys Lys Pro Cys Phe Thr Thr Asp Pro Gln Met Ser Lys Lys Cys
1 5 10 15

15 Ala Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Lys Gly Lys Cys Tyr Gly Pro Gln
20 25 30

Cys Leu Cys
35

20 $\langle 210 \rangle$ 7

<211> 38

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Variante de la clorotoxina

30 $\langle 400 \rangle$ 7

<400> 7

Arg Cys Ser Pro Cys Phe Thr Thr Asp Gln Gln Met Thr Lys Lys Cys
1 5 10 15

35 Tyr Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Lys Gly Lys Cys Tyr Gly Pro Gln
20 25 30

40 Cys Ile Cys Ala Pro Tyr
35

<210> 8

45 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> *Leiurus quinquestriatus*

50 $\langle 220 \rangle$

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Derivado de la clorotoxina: residuos de aminoácidos 23-29

55 $\langle 400 \rangle$ 8

<400> 8

Lys Gly Arg Gly Lys Ser Tyr
1 5

60

<210> 9

<211> 9

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 339 683 T3

<220>
 <223> Motivo para derivados de la clorotoxina

5 <220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
 <223> xaa puede ser Asp o Glu

10 <220> variante
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val o Pro

15 <220>
 <221> variante
 20 <222> (5)..(5)
 <223> xaa puede ser Asn o Gln

25 <220>
 <221> variante
 <222> (7)..(7)
 <223> xaa puede ser Ser, Thr, o Ala

30 <220>
 <221> variante
 <222> (8)..(8)
 35 <223> xaa puede ser His, lys o Arg

<400> 9

40 **Thr Thr Xaa Xaa Xaa Met Xaa Xaa Lys**
1 5

45 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Leiurus quinquestriatus*

50 <400> 10

55 **Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys**
1 5

60 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Chlorotoxin derivatives

ES 2 339 683 T3

<400> 11

Thr Thr Asp Gln Gln Met Thr Lys Lys
1 5

<210> 12

10 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> *Leiurus quinquestriatus hebraeus*

15 <400> 12

Thr Thr Asp Pro Gln Met Ser Lys Lys
1 5

20

<210> 13

 $\langle 211 \rangle$ 7

25 <212> PRT

<213> *Leiurus quinquestriatus*

 $\langle 220 \rangle$

30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Derivado de la clorotoxina: residuos de aminoácidos 8-14

<400> 13

Thr Asp His Gln Met Ala Arg
1 5

40

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

50 <223> Alfa péptido de clorotoxina

 $\langle 400 \rangle$ 14

55 Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Ser
1 5

<210> 15

60 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> variante del alfa péptido de clorotoxina

ES 2 339 683 T3

<400> 15

Thr Ala His Ala Met Ala Arg Lys Ser
1 5

5

<210> 16
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> variante de péptido de clorotoxina

15

<400> 16

Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Ala His Ala Met Ala Arg Lys Cys
1 5 10 15

20

Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Cys Lys Cys Tyr Gly Pro Gln
20 25 30

25

Cys Leu Cys Arg
35

30

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> derivado de la clorotoxina STP-1

40

<400> 17

Thr Asp Pro Gln Met Ser Arg
1 5

45

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Secuencias del péptido 8

55

<400> 18

Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Ser Tyr Gly
1 5 10

60

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65

ES 2 339 683 T3

<220>

<223> Secuencias del péptido 8a

5 <400> 19

Gly Lys Gly Arg Gly Lys Ser Tyr Gly
1 5

10 <210> 20

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias del péptido 8b

20 <400> 20

Lys Gly Arg Gly Lys Ser Tyr Gly
1 5

25 <210> 21

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias del péptido 8c

35 <400> 21

Gly Arg Gly Lys Ser Tyr Gly
1 5

40 <210> 22

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Secuencias del péptido 21

<400> 22

55 **Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Ser**
1 5 10

<210> 23

60 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Secuencias del péptido 21b

ES 2 339 683 T3

<400> 23

Asp His Gln Met Ala Arg Lys Ser
1 5

<210> 24

 $\langle 211 \rangle$ 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Secuencias del péptido 21c

<400> 24

20
His Gln Met Ala Arg Lys Ser
1 5

25 <210> 25

 $\langle 211 \rangle$ 6

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias del péptido 21d

35 <400> 25

40 Gln Met Ala Arg Lys Ser
1 5

<210> 26

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

50 <223> Secuencias del péptido 21a-A1

<400> 26

55 Gln Asp His Gln Met Ala Arg Lys Ser
1 5

<210> 27

 $^{60}_{\text{Co}}$ $\rightarrow$ $^{60}_{\text{Ni}}$ γ

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias del péptido 21a-A2

ES 2 339 683 T3

<400> 27

Thr Ala His Gln Met Ala Arg Lys Ser
1 5

5

<210> 28

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Secuencias del péptido 21a-A3

<400> 28

Thr Asp Ala Gln Met Ala Arg Lys Ser
1 5

20

<210> 29

25 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias del péptido 21a-A4

<400> 29

35

Thr Asp His Ala Met Ala Arg Lys Ser
1 5

40

 $\langle 210 \rangle$ 30

<211> 9

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias del péptido 21a-A5

<400> 30

Thr Asp His Gln Ala Ala Arg Lys Ser
1 5

55

<210> 31

60 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencias del péptido 21a-A7

ES 2 339 683 T3

<400> 31

His Gln Met Ala Ala Lys Ser

5

1

5

<210> 32

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Secuencias del péptido 21a-A8

20 <400> 32

Thr Asp His Gln Met Ala Arg Ala Ser
1 5

25 <210> 33

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias del péptido 21a-A9

35 <400> 33

Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Ala
1 5

40

<210> 34

<211> 9

45 <212> PRT

<213> *Mesobuthus tamulus indicus*

<220>

50 <223> Num. de Acceso a GenBank P15229, toxina pequeña

<400> 34

55 **Thr Thr Asp Gln Gln Met Ser Lys Lys**
1 5

60

65