



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 519**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06739100 .3**  
96 Fecha de presentación : **20.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1877428**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Conjugado de cianina-clorotoxina y procedimiento para la visualización intraquirúrgica del cáncer.**

30 Prioridad: **22.04.2005 US 674280 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.06.2011**

73 Titular/es: **University of Washington  
4311 11th Avenue N.E., Suite 500  
Seattle, Washington 98105-4608, US  
FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH  
CENTER**

72 Inventor/es: **Veiseh, Mandana;  
Bahrami, S-Bahram;  
Olson, James;  
Gabikian, Patrik;  
Ellenbogen, Richard;  
Sze, Raymond;  
Veiseh, Omid y  
Zhang, Miqin**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 360 519 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

Conjugado de cianina-clorotoxina y procedimiento para la visualización intraquirúrgica del cáncer

- 5 **[0001]** En muchos tipos de cánceres, la precisión de la resección quirúrgica afecta directamente el pronóstico del paciente. Desafortunadamente, la identificación intraquirúrgica de los bordes del tumor o de pequeños focos de células cancerosas resulta imprecisa o depende del juicio quirúrgico. De esta manera, la extensión de la resección quirúrgica está limitada por la necesidad de evitar el daño a estructuras vitales. No hay ninguna parte en la que sea más problemática que en el cerebro, en el que la más del 80% de los cánceres malignos se produce en el margen
- 10 quirúrgico. A pesar de los avances en la monitorización intraquirúrgica y en el guiado por imágenes, los escáneres postquirúrgicos desvelan algunas veces tumores residuales voluminosos que se hubieran podido eliminar mediante resección si el cirujano hubiera dispuesto de herramientas mejoradas para distinguir el tejido tumoral del cerebro normal. Recientes avances en biología molecular, genómica y proteómica han dado como resultado información acerca de las moléculas que se expresan en células malignas pero no en tejidos adyacentes. Esta información tiene
- 15 el potencial de transformar fundamentalmente la oncología quirúrgica si se usa para "pintar" específicamente las células tumorales con balizas moleculares dirigidas
- [0002]** La metaloproteinasa de matriz (MMP-2) tiene una expresión muy elevada en muchas neoplasias humanas comunes que incluyen glioma, melanoma, sarcoma, cáncer de mama, adenocarcinoma de colon, cáncer de próstata, tumores neuroectodérmicos, y cáncer de ovario. Se cree que MMP-2 y otros miembros de la familia MMP contribuyen a la invasión cancerosa degradando proteolíticamente el tejido no neoplásico adyacente.
- [0003]** Aislada del escorpión *Leirus quinquestratus*, la clorotoxina (CTX) es un péptido de 36 aminoácidos que se caracterizó inicialmente como un ligando que bloqueaba los canales de cloruro reconstituidos. Se pensaba que
- 25 CTX inhibía la migración de células del glioma bloqueando los canales de cloruro específicos de glioma, pero esta actividad se atribuyó posteriormente a la inhibición de MMP-2 mediada por CTX. La clorotoxina se une preferentemente a las células de glioma en comparación con el cerebro normal. Se ha aprobado recientemente un enlace radiofarmacéutico a una clorotoxina sintética, <sup>131</sup>I.TM-601, para los ensayos clínicos en Fase I/II para la terapia del cáncer cerebral basándose en un perfil de seguridad aceptable en los estudios preclínicos.
- 30 **[0004]** Los compuestos de cianina son balizas moleculares que emiten luz en el espectro del infrarrojo cercano (NIR). Puesto que la luz de esta longitud de onda se adsorbe mínimamente por el agua o la hemoglobina, las balizas NIR son muy adecuadas para la obtención de imágenes intraquirúrgicas. Intentos anteriores de obtención de imágenes de tumores cerebrales mediante NIR se han centrado en el direccionamiento de la sonda hacia la
- 35 microglía inflamatoria que rodea el tumor o en utilizar sondas que requieren de escisión proteolítica para la activación. El anterior enfoque es problemático debido a la presencia de microglía que se correlaciona poco, si acaso algo, con los márgenes de muchos tumores cerebrales. Además, para reducir el edema cerebral postquirúrgico, los pacientes se tratan con dexametasona, que es un potente inhibidor de la activación microglial.
- 40 **[0005]** El documento US 5.905.027 describe un procedimiento de diagnóstico y tratamiento de gliomas.
- [0006]** Soroceanu L. y col., Cancer Research, Vol. 58 (21) 1 de noviembre de 1998, páginas 4871-4879, describen el uso de clorotoxina para dirigirse a tumores cerebrales primarios.
- 45 **[0007]** Weissleder R. y col., Nature Medicine, Vol. 9(1) 1 de enero de 2003, páginas 123-128, describen estudios aplicando luz a dianas moleculares vivas.
- [0008]** Citrin D. y col., Molecular Cancer Therapeutics, Vol. 3(4), 2004, páginas 481-488, describen la obtención de imágenes de un tumor *in vivo* en ratones con endostatina marcada en el infrarrojo cercano.
- 50 **[0009]** Berlier J.E. y col., J. Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 51 diciembre de 2003, páginas 1699-1712, describen una comparación cuantitativa de colorantes Alexa Fluor de longitud de onda larga con colorantes Cy y sus bioconjugados.
- 55 **[0010]** El documento WO 00/62807 describe el diagnóstico y el tratamiento de tumores neuroectodérmicos
- [0011]** Deshane J. y col., J. Biol. Chem. Vol. 278(6), 7 de febrero de 2003, páginas 4135-4144, informan que la clorotoxina inhibe la invasión de células de glioma mediante la metaloproteinasa-2 de matriz

**[0012]** Jiang T. y col., PNAS USA Vol 101 (51), 21 de diciembre de 2004, páginas 17867-17872, describen la obtención de imágenes de tumores por medio de la activación proteolítica de péptidos que penetran en células.

5 **[0013]** A pesar de los avances en el desarrollo de sondas para dirigir y obtener imágenes de tumores cerebrales, y a la vista de los factores señalados anteriormente, existe una necesidad de una sonda que no necesite escisión enzimática y que permita la visualización intraquirúrgica de los tejidos cancerosos. La presente invención busca llenar esta necesidad y proporciona otras ventajas relacionadas.

10 **[0014]** En un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de clorotoxina (tal como se define en las reivindicaciones, que se puede detectar mediante obtención de una imagen de fluorescencia, que permite la visualización intraquirúrgica de los tejidos cancerosos.

15 **[0015]** El conjugado de clorotoxina de la invención se usa en la obtención de una imagen in vivo, e incluye uno o más restos Cy5.5 acoplados covalentemente a una clorotoxina.

20 **[0016]** En otra realización, el conjugado de clorotoxina fluorescente tiene una prolongada semivida in vitro. El conjugado de clorotoxina fluorescente incluye uno o más restos Cy5.5 acoplados covalentemente a una clorotoxina. En una realización, el conjugado tiene una semivida suficientemente larga para permitir la formación de una por imagen biofotónica del cáncer desde aproximadamente 4 a aproximadamente 14 días después de la administración del conjugado de clorotoxina.

25 **[0017]** Se proporcionan composiciones que incluyen el conjugado de clorotoxina. La composición es adecuada para su administración a un ser humano e incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición incluye una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado de clorotoxina.

30 **[0018]** En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos in vitro para usar el conjugado de clorotoxina para detectar tejidos de interés, según se define en las reivindicaciones.

**[0019]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para diferenciar foci de cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina a partir de tejido no neoplásico. El procedimiento incluye las etapas de:

(a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según se define en las reivindicaciones, que tiene afinidad y especificidad por células que expresan sitios de unión a clorotoxina; y

35 (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel elevado de unión, con respecto al tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.

40 **[0020]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para detectar cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina. El procedimiento incluye las etapas de:

(a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según se define en las reivindicaciones, que tiene afinidad y especificidad por células que expresan sitios de unión a clorotoxina; y

45 (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel elevado de unión, con respecto al tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.

**[0021]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para detectar células que expresan un complejo de proteína de metaloproteínasa de matriz (MMP-2). El procedimiento incluye las etapas de:

50 (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según se define en las reivindicaciones que tiene afinidad y especificidad por el complejo de proteína de metaloproteínasa de matriz (MMP-2); y

55 (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel elevado de unión, con respecto al tejido normal, es indicativo de la presencia de un tumor que expresa el complejo de proteína de metaloproteínasa de matriz (MMP-2)

**[0022]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para determinar la localización en un paciente de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina, según se define en las reivindicaciones.

**[0023]** En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina en un paciente, con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

**[0024]** En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina, con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 **[0025]** En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un tumor que expresa el complejo de proteína de metaloproteinasas de matriz (MMP-2), con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 **[0026]** En una realización, la invención proporciona la inhibición de la actividad invasiva de las células que expresan sitios de unión a clorotoxina, con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0027]** Se describen también en el presente documento los procedimientos para preparar los conjugados de clorotoxina.

20

#### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0028]** El fichero de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos en color tras solicitud y pago de los gastos necesarios.

25

**[0029]** Los anteriores aspectos y muchas de las ventajas asociadas de esta invención se apreciarán más fácilmente de manera que la misma será mejor comprendida por referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se tome junto con los dibujos que la acompañan en los que:

30

La FIGURA 1A es una fotografía intraquirúrgica que ilustra el problema clínico, el tejido intrínseco del tumor cerebral es a menudo indistinguible del tejido del cerebro normal;

35

La FIGURA 1B es una resonancia magnética (RM) postquirúrgica que muestra la imagen de grandes residuos de la enfermedad en sitios en los que el glioma era indistinguible intraquirúrgicamente del cerebro adyacente a pesar de la monitorización electrofisiológica intraquirúrgica.

40

Las FIGURAS 2A-2F son imágenes que ilustran la obtención de una imagen biofotónica del glioma; La Figura 2A y 2B muestra un conjugado de clorotoxina representativo de la invención (CTX: Cy5.5) que emite una señal procedente de cada una de las células 9L de glioma en el cultivo (FIGURA 2A), pero no consigue unirse a fibroblastos (FIGURA 2B); la FIGURA 2C ilustra que la unión específica de CTX: Cy5.5 se detecta en xenoinjerto de glioma, pero no por otra parte en órganos normales de un ratón que tiene un xenoinjerto de células 9L de glioma 32 días después de la administración sistémica de 0,2 ml de conjugado 10 µM; la FIGURA 2D ilustra imágenes biofotónicas de cerebros inyectados estereotáxicamente con células 9L de glioma (parte superior), animales sometidos a cirugía de control simulada (parte media) y sin cirugía de control (parte inferior) tomadas 1,5 días después de la administración de 0,2 ml de conjugado 10 µM; la FIGURA 2E ilustra secciones teñidas de HyE procedentes del tálamo con invasión de células 9L de glioma (parte superior) y de tálamo de control sin inyectar (parte inferior), estas imágenes corresponden a las regiones designadas en la FIGURA 2D; y la FIGURA 2F ilustra la inhibición de la unión de CTX: Cy5.5 mediante el bloqueante de MMP-2, 1,10-fenantrolina (parte superior izquierda y parte inferior izquierda) en comparación con la unión en ratones de control que no reciben 1,10-fenantrolina (parte superior y parte inferior derecha). Las FIGURAS 3A-3D son imágenes que ilustran la detección de meduloblastoma autoinjertado en ratones genomanipulados; la Figura 3A ilustra imágenes biofotónicas de un ratón natural exento de tumor (izquierda) y de un ratón ND2: SmoA1 (derecha), los ratones se inyectaron con 0,2 ml de 10 µM de un conjugado de clorotoxina representativo de la invención (CTX: Cy5.5) 1,5 días antes de la obtención de la imagen; la FIGURA 3B ilustra imágenes de cerebros de los mismos ratones tras la necropsia; la FIGURA 3C ilustra la confirmación histológica del meduloblastoma (derecha) en comparación con el cerebelo normal (izquierda); y la FIGURA 3D ilustra imágenes de microscopía confocal procedentes de los mismos cerebros que se muestran en la FIGURA 3B demostrando la práctica ausencia de señal de Cy5.5 en el control (izquierda) y una elevada señal en el

55

meduloblastoma (derecha);

Las FIGURAS 4A-4E son imágenes que ilustran la especificidad de un conjugado de clorotoxina representativo de la invención (CTX:Cy5.5) para el cáncer de próstata humano y de ratón; la FIGURA 4A ilustra imágenes fluorescentes de la señal Cy5.5 (rojo) en foci de cáncer de próstata (CAP) adyacentes a próstata normal (NP, autofluorescencia verde) en especímenes quirúrgicos humanos (paneles 1º y 3º), el panel 5º es próstata normal, que no muestra señal de Cy5.5, las correspondientes secciones adyacentes teñidas con HyE se muestran a la derecha de cada imagen NIR; La FIGURA 4B ilustra imágenes biofotónicas de próstata y otros órganos procedentes de ratón TRAMP (panel superior) y del control natural (panel inferior) que muestran señal específica en próstata TRAMP (CAP) y pulmón (flecha roja), se obtuvieron las imágenes 5,5 días después de la inyección de 0,1 ml de 10 µM de conjugado, órganos de la hilera superior: cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, bazo, e hilera inferior: próstata; la FIGURA 4C ilustra secciones con microscopía confocal de las mismas muestras de próstata que se muestran en la FIGURA 4B, estuvo presente una elevada unión de CTX:Cy5.5 en prácticamente cada célula del cáncer de próstata (parte superior izquierda) y fue mínima en la próstata normal (parte inferior izquierda), la secciones adyacentes teñidas con HyE (centro) muestran metástasis pulmonar en el pulmón del ratón TRAMP (parte superior derecha) que es brillante en la FIGURA 4B y pulmón normal procedente del ratón del control (parte inferior derecha); y la FIGURA 4D ilustra imágenes intraquirúrgicas del abdomen del ratón de control (izquierda) y TRAMP (derecha) tras la eliminación del intestino, la próstata, y el hígado, fueron positivos múltiples nódulos linfáticos mediante diagnóstico por imagen biofotónica e histología, un nódulo de tejido de 1,5 mm de diámetro que fue muy brillante en la imagen obtenida desveló tres pequeños foci de células de cáncer de próstata en canales linfáticos rodeados por tejido graso y reactivo (L), se detectaron cantidades de señal menores en la grasa (F) y los testículos (T); la FIGURA 4E ilustra una sección teñida con hematoxilina y eosina que muestra un pequeño foco de células cancerosas en un canal linfático (marcado L en la FIGURA 4D) y en un nódulo linfático que contienen el cáncer;

Las FIGURAS 5A-5F ilustran la obtención de imágenes de adenocarcinomas y sarcomas con un conjugado de clorotoxina representativo de la invención (CTX:Cy5.5); la FIGURA 5A es una sección de adenocarcinoma teñida con HyE que se muestra en la FIGURA 5B; la FIGURA 5B ilustra imágenes biofotónicas de adenocarcinoma (izquierda) y adenoma (derecha) que muestran una clara delineación del intestino normal; la FIGURA 5C ilustra la confirmación histológica del adenoma que se muestra en la FIGURA 5B; la FIGURA 5D ilustra imágenes NIR de un xenoinjerto de rhabdomyosarcoma RH30 de ratón que no se inyectó con CTX:Cy5.5 (superior) y un ratón que recibió 0,2 ml de 10 µM de CTX:Cy5.5 1,5 días antes de la obtención de la imagen; la FIGURA 5E ilustra imágenes confocales de los correspondientes tumores de ratones que no se inyectaron (izquierda) y que se inyectaron (derecha); y la FIGURA 5F es un análisis histopatológico de xenoinjerto de rhabdomyosarcoma.

La FIGURA 6 son imágenes de tumores del flanco de un glioma de células 9L obtenidas mediante un conjugado fluoróforo de clorotoxina representativo de la invención (CTX:Cy5.5) 24 horas después de la inyección, que muestran cuatro ratones representativos con señal aumentada en tumor (RET) en comparación con tejido no neoplásico adyacente (REBG), en ese momento, la señal del tumor fue de 2,1 +/- 0,2 (promedio +/- SEM, n = 16), las regiones brillantes fuera del círculo rojo son de riñón, a través de cual se excretó el conjugado; las FIGURAS 7A-7E ilustran una comparación de tres fluoróforos conjugados con clorotoxina; la Figura 7A muestra una señal no específica de tumor que se observa con CTX:fluoresceína en ratones que tienen gliomas con células 9L en la primera hora después de la obtención de la imagen; la FIGURA 7B ilustra la parte izquierda un ratón que se inyectó con CTX:fluoresceína directamente en el tumor para demostrar que el conjugado estaba emitiendo y que se detectaba apropiadamente; la FIGURA 7C ilustra un ratón con un glioma de células 9L diagnosticado por imagen 1 hora después de la inyección de CTX:ALEXA-680 que muestra señal en el tumor; la FIGURA 7D es una imagen 24 horas después de la inyección, se observó una excelente señal procedente de CTX:Cy5.5 en el tumor en comparación con el flanco no neoplásico opuesto (la señal encima del tumor es de la excreción del bioconjugado por el riñón), se observa una señal más débil procedente del tumor en el ratón nº 2 tratado con ALEXA-680, pero no en el nº 1, la reinyección del ratón nº 1 dio como resultado un rápido aclaramiento del conjugado procedente de tejido no neoplásico y tumoral que muestra que el conjugado se aclaró rápidamente en este ratón; y la FIGURA 7E son imágenes de los mismos animales que en panel de la FIGURA 7D, la señal permanece en ratón inyectado con CTX:Cy5.5, pero no se observó señal específica de tumor en ratones inyectados con CTX:ALEXA-680; tomados en conjunto, los datos indican que no se observa señal específica de tumor con CTX:Fluoresceína y que se alcanza a ver brevemente una débil señal procedente de CTX:ALEXA-680 en comparación con CTX:Cy5.5 indicando que el conjugado de CTX:Cy5.5 es superior a otros conjugados ensayados en términos de distribución específica en el tumor y la duración global de la señal del tumor;

Las FIGURAS 8A y 8B proporcionan la evidencia genética de que MMP-2 está implicada en la unión de CTX a células cancerosas; la FIGURA 8A muestra que células MCF-7 de cáncer de mama teñidas con un anticuerpo contra MMP-2 (verde) y CTX: Cy5.5 (rojo) muestran mínima unión de MMP-2 y mínima unión de CTX: Cy5.5, el núcleo se tiñó con DAPI para apoyar la localización celular en la imagen; y la FIGURA 8B muestra células MCF-7 de cáncer de mama tras la transfección con un plásmido que codifica MMP-2, la tinción con el anticuerpo contra MMP-2 muestra que la transfección dio como resultado la expresión de MMP-2 en esta célula (verde), la tinción de CTX: Cy5.5 (rojo) es mucho mayor que en cualquiera de las células del control, el amarillo muestra regiones celulares en las que la señal de MMP-2 y la señal de CRX: Cy5.5 están solapando, no se muestra la tinción DAPI para optimizar la visualización de la unión de MMP-2 y CTX: Cy5.5;

Las FIGURAS 9A y 9B ilustran la HPTLC de los patrones de fosfolípidos y de los lípidos aislados procedentes de varias líneas celulares que se indican; la FIGURA 9A es una imagen de una placa de HPTLC que se desarrolló en cloroformo: metanol: agua (65:25:4) y los lípidos se visualizaron con el colorante lipófilo, primulin; y la FIGURA 9B es una imagen de una HPTLC revestida de lípidos con CTX: Cy5.5 1  $\mu$ M; abreviaturas: PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; PIP2, 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomiolina;

Las FIGURAS 10A-10E ilustran la unión de CTX: Cy5.5 en tumores cerebrales en comparación con el cerebro normal en secciones histológicas; FIGURA 10A, sección de glioma teñida con hematoxilina y eosina (HyE); FIGURA 10B, tinción con CTX: Cy5.5 del mismo glioma; FIGURA 10C, Cy5.5 solo no tiñe el glioma; FIGURA 10D, sección de cerebro normal del mismo paciente teñida con HyE; y FIGURA 10E, CTX: Cy5.5 no tiñe el cerebro normal;

La FIGURA 11 ilustra la actividad de MMP-2 y MMP-9 en tumores de ratón y tejido normal; se llevaron a cabo los ensayos de la gelatinasa para evaluar la expresión de MMP-2 en los tejidos relacionados anteriormente; se detectó la actividad de MMP-2 en todos los foci de cáncer que se habían detectado mediante CTX: Cy5.5, pero no en el tejido no neoplásico correspondiente; y se detectó la actividad de MMP-9 en tumores de meduloblastoma de ratón (SmoAI) y tumor de próstata, pero no en tumores xenoinjertados o tejidos normales;

La FIGURA 12 ilustra la actividad de MMP-2 y MMP-9 en líneas celulares y medios procedentes de líneas celulares. Parte superior: la actividad de la gelatinasa en células separadas de medios muestra muy poca actividad de MMP-2 en células 9L y mucha más actividad en células U87 a pesar del hecho de que las células 9L se unen a CTX: Cy5.5 así como a las células U87. Parte inferior: Niveles mucho mayores de MMP-2 y MMP-9 en medios de células 9L y U87 que en aglomerados celulares. En conjunto, esto sugirió que los MMP secretados pueden jugar un importante papel en la unión de CTX: Cy5.5 a las células cancerosas; y

Las FIGURAS 13A-13F ilustran CTX: Cy5.5 en medios procedentes de células con elevados niveles de células secretadas teñidas con MMP-2 y MMP-9 que son negativas para la tinción solo con CTX: Cy5.5; la FIGURA 13A muestra que células MCF-7 incubadas con CTX: Cy5.5 fracasan en emitir en el espectro (rojo) del infrarrojo cercano (Cy5.5), los núcleos están teñidos de azul con DAPI; la FIGURA 13B muestra una placa hermana de células MCF-7 incubadas con la misma cantidad de CTX: Cy5.5 que en la FIGURA 13A, excepto que este CTX: Cy5.5 se transfirió a los medios después de 24 horas de exposición a células 9L de glioma (células MCF-7 teñidas con CTX: Cy5.5 bajo esta condición); la FIGURA 13C muestra una placa hermana de células MCF-7 teñidas con CTX: Cy5.5 usando medios acondicionados procedentes de células U87; la FIGURA 13D muestra la tinción con CTX: Cy5.5 de células HeLa, no hay tinción de rojo, lo que indica ausencia de señal de CTX: Cy5.5; la FIGURA 13E muestra una placa hermana de células HeLa teñida con CTX: Cy5.5 en medios acondicionados procedentes de células 9L; y la FIGURA 13F muestra una placa hermana de células HeLa teñidas con CTX: Cy5.5 en medios acondicionados procedentes de células U87.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0030]** La presente invención proporciona un conjugado de clorotoxina según se define en las reivindicaciones, que se puede detectar mediante obtención de imagen de fluorescencia, que permite la visualización intraquirúrgica de tejidos cancerosos, y los usos del conjugado de clorotoxina.

**[0031]** En un aspecto, los conjugados de clorotoxina permiten la visualización intraquirúrgica de tejidos cancerosos.

**[0032]** La clorotoxina es un agente director que dirige el conjugado a un tejido de interés. El conjugado de clorotoxina de la invención incluye uno o más restos Cy5.5 acoplados covalentemente a una clorotoxina.

**[0033]** La clorotoxina puede ser una clorotoxina natural, clorotoxina sintética, o clorotoxina recombinante. Se pueden usar también fragmentos y variantes de clorotoxina que tienen actividad de unión a la clorotoxina (por ejemplo, especificidad y afinidad por tejidos cancerosos).

**[0034]** Según se usa en el presente documento, el término “resto fluorescente que emite en el rojo o en el infrarrojo cercano” se refiere a un resto fluorescente que tiene un máximo de emisión de fluorescencia mayor que aproximadamente 600 nm. Los conjugados de clorotoxina fluorescentes que tienen restos fluorescentes que emiten en una longitud de onda más corta (por ejemplo, desde aproximadamente 500 a aproximadamente 600 nm) son útiles en la obtención de imagen histoquímica. Estos conjugados pueden ser menos útiles para la obtención de imagen en seres humanos y animales en la que se prefieren restos fluorescentes que emiten en una longitud de onda más larga (por ejemplo, mayor de aproximadamente 600 nm).

**[0035]** Se pueden derivar los restos fluorescentes a partir de compuestos fluorescentes caracterizados por máximos de emisión de longitud de onda mayores de aproximadamente 600 nm para evitar la autofluorescencia, la emisión que viaja a través de milímetros a un centímetro de tejido/sangre/fluidos, emisión que no adsorbe la hemoglobina, otros componentes de la sangre, o las proteínas en tejido humano o animal.

**[0036]** El resto fluorescente se acopla covalentemente a la clorotoxina para permitir la visualización del conjugado mediante obtención de imagen de fluorescencia. El resto fluorescente se deriva de un compuesto fluorescente. Los compuestos fluorescentes adecuados son aquellos que se pueden acoplar covalentemente a una clorotoxina sin afectar adversamente de manera sustancial a la función de dirección y unión del conjugado de clorotoxina. Similarmente, los compuestos fluorescentes adecuados retienen sus propiedades fluorescentes tras la conjugación con la clorotoxina.

**[0037]** El resto fluorescente Cy5.5 es un resto de cianina. Los compuestos de cianina se caracterizan por sus elevados coeficientes de extinción relativos y rendimientos cuánticos fluorescentes favorables. La longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia para un compuesto de cianina varía en función de la estructura de cianina. Dependiendo del compuesto de cianina particular, las longitudes de onda máximas de emisión de fluorescencia pueden variar desde el verde (aproximadamente 490 nm) al infrarrojo cercano (aproximadamente 740 nm). En la práctica de los procedimientos de la invención, se prefieren los compuestos de cianina que tienen emisiones máximas de fluorescencia en el rojo lejano (aproximadamente 650 nm) al infrarrojo cercano (aproximadamente 750 nm). A estas longitudes de onda de emisión, la fluorescencia de fondo procedente del entorno local es mínima y los tejidos de interés son relativamente transparentes. Debido a estas longitudes de onda, se maximiza la excitación y la visualización de la emisión de la fluorescencia y se pueden observar cantidades relativamente mayores de tejido dirigidas por el conjugado de la invención en comparación con otros conjugados que utilizan compuestos fluorescentes que tienen la emisión a longitudes de onda más cortas (menos de 600 nm).

**[0038]** Las cianinas incluyen los flúores CYDYE comercialmente disponibles de GE Healthcare con la designación Cy2 (506 nm); Cy2 (506 nm); Cy3 (570 nm); Cy3B (572 nm); Cy3.5 (596 nm); Cy5 (670 nm); Cy5.5 (675 nm); y Cy7 (694 nm) (emisiones máximas en paréntesis). El compuesto de cianina es Cy5.5. En el Ejemplo 1 se describe la preparación de un conjugado de cianina-clorotoxina según se define en las reivindicaciones.

**[0039]** En la Patente de los Estados Unidos N° 6.130.101 se describen compuestos de xanteno sulfonados, y están comercialmente disponibles con la designación ALEXA FLUOR de Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. ALEXA FLUOR es la designación de una familia de fluoróforos que se caracterizan por sus elevados coeficientes de extinción relativos y rendimientos cuánticos fluorescentes favorables. La longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia de un compuesto de xanteno sulfonado varía como una función de la estructura del compuesto. Dependiendo del compuesto de xanteno sulfonado particular, la longitud máxima de emisión de fluorescencia puede variar desde el verde (aproximadamente 450 nm) al infrarrojo cercano (aproximadamente 780 nm). En la práctica de los procedimientos de la invención, se prefieren los compuestos ALEXA FLUOR que tienen emisiones máximas de fluorescencia en el rojo lejano (aproximadamente 650 nm) al infrarrojo cercano (aproximadamente 750 nm).

**[0040]** Los compuestos de xanteno sulfonados incluyen ALEXA FLUORES, tales como ALEXA FLUOR 350 (442 nm), ALEXA FLUOR 405 (421 nm), ALEXA FLUOR 488 (539 nm), ALEXA FLUOR 500 (525 nm), ALEXA FLUOR 514 (540 nm), ALEXA FLUOR 532 (554 nm), ALEXA FLUOR 546 (575 nm), ALEXA FLUOR 555 (565 nm), ALEXA FLUOR 568 (603 nm), ALEXA FLUOR 594 (617 nm), ALEXA FLUOR 610 (628 nm), ALEXA FLUOR 633 (647 nm),

- ALEXA FLUOR 635 (645 nm), ALEXA FLUOR 647 (668 nm), ALEXA FLUOR 660 (690 nm), ALEXA FLUOR 680 (702 nm), ALEXA FLUOR 700 (719 nm), y ALEXA FLUOR 750 (779 nm) (emisiones máximas en paréntesis). Pueden prepararse conjugados de xanteno-clorotoxina sulfonados de manera análoga a la descrita para la conjugación de cianina en el Ejemplo 1 y según se describe adicionalmente en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Richard P. Haugland (Molecular Probes, Inc., una filial de Invitrogen Corp.).
- 5 **[0041]** Los compuestos fluorescentes adecuados incluyen un grupo funcional que vuelve el compuesto químicamente reactivo hacia la clorotoxina. Los grupos funcionales adecuados incluyen el grupo de la N-hidroxisuccinimida (NHS) para el acoplamiento covalente a grupos tioles, y el grupo hidrazida para el acoplamiento covalente a grupos aldehído. Preferiblemente, el compuesto fluorescente útil en la preparación del conjugado de la invención incluye un único grupo funcional reactivo (por ejemplo, éster mono-NHS). Se apreciará que son adecuadas otras químicas de conjugación para preparar el conjugado de clorotoxina de la presente invención.
- 10 **[0042]** Los conjugados adecuados de la invención incluyen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 restos de Cy5.5/clorotoxina. En una realización, el conjugado incluye aproximadamente 1 resto de Cy5.5.
- 15 **[0043]** En el Ejemplo 1 se describe la preparación de un conjugado de clorotoxina representativo de la invención. En el Ejemplo 2 se describe un conjugado de clorotoxina representativo de la invención que usa obtención de imagen in vitro. En el Ejemplo 3 se describe un conjugado de clorotoxina representativo de la invención que usa obtención de imagen in vivo. En el Ejemplo 4 se describe la implicación de MMP-2 en la unión de clorotoxina.
- 20 **[0044]** En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de clorotoxina fluorescente según se define en las reivindicaciones que tiene una prolongada semivida in vivo. El conjugado de clorotoxina fluorescente incluye uno o más restos Cy5.5 acoplados covalentemente a una clorotoxina. En una realización, el conjugado tiene una semivida suficientemente larga para permitir la obtención de imagen biofotónica del cáncer de aproximadamente 4 a aproximadamente 14 días después de la administración del conjugado de clorotoxina.
- 25 **[0045]** En el presente documento, se describen composiciones que incluyen el conjugado de clorotoxina. La composición es adecuada para la administración a sujetos humanos y animales e incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición incluye una cantidad farmacológicamente eficaz de un conjugado de clorotoxina. Se puede determinar de manera rutinaria una cantidad eficaz mediante procedimientos establecidos. Una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para ocupar los sitios de unión de la clorotoxina en las células cancerosas pero suficientemente baja para minimizar la unión no específica a tejidos no neoplásicos. Una cantidad eficaz optimiza la relación señal a ruido para la obtención de imagen intraquirúrgica.
- 30 **[0046]** En otros aspectos, la memoria descriptiva describe los usos del conjugado de clorotoxina para detectar y tratar tejidos de interés.
- 35 **[0047]** La invención proporciona la detección de un tejido usando los conjugados de clorotoxina. Los conjugados de clorotoxina de la invención se dirigen y se unen mediante sitios de unión a clorotoxina. Se apreciará que los sitios de unión a clorotoxina pueden tomar dos formas: sitios que se unen a clorotoxina y sitios que se unen a conjugados de clorotoxina de la invención. Se apreciará que los sitios de unión a clorotoxina pueden ser distintos de los sitios de unión a conjugados de clorotoxina.
- 40 **[0048]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para diferenciar foci de cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina de tejido no neoplásico. El procedimiento incluye las etapas de:
- 45 (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según se define en las reivindicaciones que tiene afinidad y especificidad para las células que expresan sitios de unión a clorotoxina; y
- 50 (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel elevado de unión, en relación al tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.
- 55 **[0049]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para detectar cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina. El procedimiento incluye las etapas de:
- (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según se define en las reivindicaciones que tiene afinidad y especificidad para las células que expresan sitios de unión a clorotoxina; y



(b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel elevado de unión, en relación al tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.

5 **[0050]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para detectar células que expresan el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2). El procedimiento incluye las etapas de:

10 (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según se define en las reivindicaciones que tiene afinidad y especificidad para el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2); y

15 (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel elevado de unión, en relación al tejido normal, es indicativo de la presencia de un tumor que expresa el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2).

15 **[0051]** El complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (mump-2) puede estar unido a membrana.

20 **[0052]** En una realización, se proporciona un procedimiento in vitro para determinar la localización en un paciente de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina, según se define en las reivindicaciones.

20 **[0053]** Los procedimientos de obtención de imagen de la invención para la detección de foci de cánceres son aplicables a ratón y otros modelos animales de cánceres así como a la práctica veterinaria.

25 **[0054]** La invención proporciona el tratamiento de un tejido usando los conjugados de clorotoxina.

25 **[0055]** En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina en un paciente, con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 **[0056]** En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina, con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 **[0057]** En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un tumor que expresa el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2), con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 **[0058]** En una realización, la invención proporciona la inhibición de la actividad invasiva de células que expresan sitios de unión a clorotoxina, con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el conjugado de clorotoxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 **[0059]** Los usos terapéuticos de la invención son aplicables a sujetos humanos y animales que necesitan dicho tratamiento.

45 **[0060]** Los conjugados de clorotoxina de la invención son útiles para detectar y tratar diversos cánceres (por ejemplo, cáncer de próstata, sarcomas, neoplasias hematológicas y leucemias) y diversos tumores neuroectodérmicos (por ejemplo, glioma, meningioma, ependimoma, meduloblastoma, neuroblastoma, glioblastoma, ganglioma, feocromocitoma, melanoma, sarcoma de Ewing, carcinoma de pulmón de células pequeñas y tumores cerebrales metastásicos).

50 **[0061]** Basándose en la bibliografía actual, se espera virtualmente que cada tipo de cáncer maligno que muestra la expresión de MMP-2 se una específicamente a los conjugados de clorotoxina de la invención (CTX:CY5.5). Estos cánceres malignos incluyen gliomas, astrocitomas, meduloblastomas, carcinomas del plexo coroideo, ependimomas, otros tumores cerebrales, neuroblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de intestino, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, sarcomas (unos 30 tipos), Osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, carcinomas; melanomas, cáncer de ovario, cáncer cervical, linfoma, cáncer de tiroides, cáncer anal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, tumores de células germinales, cáncer de laringe, mieloma múltiple, cáncer de próstata, retinoblastoma, cáncer gástrico, cáncer de testículos, y tumor de Wilm.

**[0062]** El conjugado de clorotoxina fluorescente de la invención puede incluir otros agentes útiles. Otros agentes útiles incluyen agentes diagnósticos y agentes terapéuticos.

5 **[0063]** Los agentes diagnósticos adecuados incluyen agentes que proporcionan la detección de la nanopartícula mediante otros procedimientos diferentes de la obtención de imagen fluorescente. Otros agentes diagnósticos adecuados incluyen radiomarcas (por ejemplo, compuestos radioisotópicamente marcados) tales como <sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C, y <sup>31</sup>P, entre otros.

10 **[0064]** Los agentes terapéuticos adecuados incluyen agentes citotóxicos. Los agentes terapéuticos representativos incluyen agentes quimioterapéuticos como metotrexato, docetaxel, cisplatino, y etopósido, entre otros. Otros agentes terapéuticos incluyen moléculas de ácido nucleico (por ejemplo ADN y ARN, tal como ARNip) para cánceres y enfermedades específicas.

15 **[0065]** La cirugía sigue siendo un componente principal de la terapia contra el cáncer. Recientes avances en oncología quirúrgica han incluido directrices para la obtención de imagen y soluciones mínimamente invasivas tales como endoscopia que limita la morbilidad u mejora la extensión de la resección. Estos procedimientos dependen en gran parte del juicio del cirujano para la delineación visual de la interfase del tumor/tejido normal. Las mejoras en la identificación y la excisión de tejidos cancerosos se traducen en resultados quirúrgicos mejorados. La técnica de "pintura del tumor" descrita en el presente documento combina una guía visual intuitiva para el cirujano con el  
20 potencial para la mejora significativa en la fiabilidad y la seguridad en virtud de su precisión molecular.

**[0066]** La presente invención proporciona un conjugado de clorotoxina (CTX: Cy5.5) que permite la obtención de imagen biofotónica en tiempo real de foci de cánceres malignos tan pequeños como 1,5 mm. El mismo agente delineó claramente células de cáncer de próstata maligno de próstata normal a una única resolución en muestras de  
25 biopsia quirúrgica humana, estableciendo la relevancia de los estudios en ratón para la enfermedad humana. Véanse los Ejemplos 2 y 3. Todos los tejidos que se enviaron a patología etiquetados como cánceres basándose en la señal de CTX: Cy5.5 fueron cancerosos y todos los tejidos normales adyacentes fueron histológicamente normales. La resolución de los foci de cánceres de las de tejido normal bajo condiciones de operación simuladas fue exquisita.

30 **[0067]** La detección en tiempo real del cáncer intraquirúrgico no sería factible si el conjugado circulante no unido se derramara en el campo de la operación cada vez que se dañara un vaso sanguíneo. Un hallazgo inesperado y bienvenido fue la larga duración de la actividad del conjugado. Los péptidos se consideran a menudo malos candidatos para el diagnóstico o la terapéutica debido a que muchos tienen una corta semivida. La observación de  
35 que las células de glioma estaban iluminadas 32 días después de la inyección del conjugado aumentó la posibilidad de que CTX: Cy5.5, un conjugado de clorotoxina representativo de la invención pudiera usarse como "pintura del tumor" para permitir a los cirujanos detectar residuos de la enfermedad o pequeños foci de la enfermedad intraquirúrgicamente.

40 **[0068]** Se demostró anteriormente que clorotoxina (CTX) se unía a células de tumor neuroectodérmico, pero no se había demostrado que se uniera a cáncer de próstata, cáncer de colon o sarcomas. La unión de CTX a células de meduloblastoma contradice los informes previos de que MMP-2 no se expresa mucho en meduloblastoma. Según se describe en el presente documento, las células de meduloblastoma expresan MMP-2. Además, la microscopía confocal de múltiples tipos de cánceres mostró la unión a casi cada célula cancerosa, que fue mayor que la  
45 esperada basándose en los informes previos de la expresión heterogénea de MMP-2. Sigue sin estar claro si CTX se une a otras MMP o se une a los canales de cloruro específicos de glioma. Fuera cual fuere el alcance de las dianas, los procedimientos de la invención muestran que tras la excreción de CTX: Cy5.5 no unidos, que tarda aproximadamente 5 días en ratones, todos los órganos normales excepto el riñón emiten una señal mínima.

50 **[0069]** Se pensó originalmente que clorotoxina se unía a un canal de cloruro y los primeros estudios indicaron que esto mejoraba el flujo de cloruro transmembrana. El uso de una toxina del canal de cloruro que cruza la barrera hematoencefálica podría obviamente ser problemático para la aplicación clínica de sondas basadas en CTX. Un reciente trabajo ha determinado que la clorotoxina no se une a los canales iónicos de cloruro y que el informe original fue científicamente erróneo en la práctica de los procedimientos de la invención, la unión específica de  
55 CTX: Cy5.5 a tejido cerebral no neoplásico fue mínima. Además, no se observaron déficits neurológicos o de comportamiento y no se observó neuropatología en los cerebros de ratones que se había expuesto a CTX: Cy5.5. Esto es consistente con la ausencia de neurotoxicidad en otros estudios, incluyendo uno que implicó la inyección directa de CTX en cerebro de ratón. No se observaron cambios patológicos en otros órganos y no se observó alteración en los electrolitos, recuentos sanguíneos, o pruebas de la función renal y hepática.

- 5 **[0070]** El conjugado de clorotoxina de la invención permite la detección y la monitorización de una variedad de cánceres en modelos de ratón. Esta solución añade un valor particular a los modelos de ratones genomanipulados (GEM) de cánceres humanos, que en contraste a los modelos de cánceres xenoinjertados o mutagénicos, desarrollas cánceres *in situ*, como resultado de genomanipulación que resume la enfermedad humana. Una ventaja particular de los ratones GEM es que los tumores se pueden estudiar desde etapas iniciales a avanzadas para entender mejor la evolución del crecimiento, la angiogénesis, la invasión local, la metástasis, la respuesta al fármaco y la resistencia al fármaco.
- 10 **[0071]** Desafortunadamente, la escasez de soluciones de obtención de imagen no invasiva, ha limitado fuertemente la completa utilización de los modelos GEM de cáncer. Por ejemplo, antes del desarrollo de los conjugados de clorotoxina de la invención, los medios principales de monitorización de ratones SmoA1 para el meduloblastoma eran el examen neurológico. En estos ratones, los primeros signos neurológicos se producen normalmente solo cuando la masa del tumor es tan grande que se produce la muerte poco después. Además, los
- 15 micro-CT fracasan en distinguir tumores en las fosas posteriores de los ratones y la MRI es muy costosa. La capacidad de detectar tumores en la etapa inicial para estudios moleculares o terapéuticos se puede mejorar drásticamente mediante una técnica de obtención de imagen en tiempo real tal como la que se proporciona mediante los procedimientos de la invención.
- 20 **[0072]** La presente invención proporciona un conjugado de clorotoxina (CTX:Cy5.5) que permite la obtención de imagen biofotónica de gliomas y sarcomas xenoinjertados. El conjugado de clorotoxina distingue también eficazmente el meduloblastoma autoinjertado, los cánceres de próstata e intestino de los tejidos normales en ratones genomanipulados (GEM). Se detectaron fácilmente las metástasis en pulmones y nódulos linfáticos. Los especímenes de tumores humanos mostraron una correlación perfecta entre la unión de CTX:Cy5.5 y los restos de
- 25 células de cáncer de próstata. Estos datos, junto con los estudios de distribución y toxicidad favorables demuestran la infectividad de los conjugados de clorotoxina de la invención en la detección intraquirúrgica y la resección óptima de los tejidos cancerosos.

30 **[0073]** Se proporcionan los siguientes ejemplos a objeto de ilustrar la presente invención.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

35 LA PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CONJUGADO DE CLOROTOXINA REPRESENTATIVO: CTX:Cy5.5

40 **[0074]** Se preparó CTX:Cy5.5, un conjugado de clorotoxina representativo de la invención conjugando Cy5.5 con clorotoxina,

45 **[0075]** Se sintetizó el conjugado usando una mezcla de CTX (Alomone Labs, Israel, 250 µl de 2 mg/ml en tampón bicarbonato 50 mM, pH 8,5) y éster de Cy5.5-NHS (Amersham Biosciences, Suecia, 43 µl de 10 mg/ml en dimetilformamida anhidra). Se llevó a cabo la conjugación en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó el colorante no conjugado mediante diálisis frente a PBS (3 veces) usando una membrana Slide-A-Lyzer (Pierce Biotechnology, IL) (corte de Mr, 3500) durante 9 horas a 4°C. Se diluyeron las muestras con PBS para producir 1 y 10 µM de disolución de CTX y se filtraron con un filtro de jeringuilla de 0,2 µm antes del uso.

50 **[0076]** Se cuantificó la concentración de CTX usando el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se cuantificó la concentración de fluoróforo en la misma disolución y se evaluó para determinar la relación de fluoróforo/CTX.

### EJEMPLO 2

55 OBTENCIÓN DE IMAGEN IN VITRO CON UN CONJUGADO DE CLOROTOXINA REPRESENTATIVO: CTX:Cy5.5

**[0077]** Se mantuvieron células 9L/lacZ de gliosarcoma (ATCC, VA) y fibroblastos primarios de prepucio humano (HFF) en medio DMEM y RPMI, suplementados ambos con piruvato de sodio al 1%, estreptomina/penicilina al 1% y FBS al 10% (Hyclone, UT), respectivamente. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células sobre cubres estériles 36 horas antes del marcado y de la microscopía confocal. Se cultivaron las células con 1 ml de conjugado de CTX:Cy5.5 (1 µm)

durante 2 horas, en una incubadora a 37°C humidificada mantenida en CO<sub>2</sub> al 5%. Se lavaron los cubres 2 veces en medio de cultivo celular y 2 veces en tampón PBS. Tras esta etapa, se tiñeron las membranas celulares con una disolución 1 µM de FM 1-43FX (Molecular Probes, OR) durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se lavó 2 veces en PBS y se fijó en paraformaldehído al 4%. Se tiñeron los núcleos celulares con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma Aldrich, MO).

**[0078]** Se adquirieron imágenes confocales usando un Microscopio de Desconvolución de Campo Amplio DeltaVision SA3.1 (Applied Precision, WA) equipado con filtros DAPI, TRITC, y Cy5. Se llevó a cabo el procesamiento de la imagen usando SoftWoRX (Applied Precision, WA).

**[0079]** Obtención de imagen biofotónica de glioma. Para determinar si CTX retuvo la unión específica a células de glioma tras la conjugación a Cy5.5, los inventores incubaron el conjugado con células 9L de glioma y fibroblastos primarios y evaluaron la unión mediante microscopía NIR. Todas las células 9L de glioma expuestas a CTX: Cy5.5 emitieron señal en el espectro NIR (FIGURA 2A) mientras que no se detectó señal de los fibroblastos tratados con la misma concentración de conjugado (FIGURA 2B). Se bloqueó la unión de CTX: Cy5.5 a células 9L de glioma mediante preincubación con 1,10-fenantrolina, un inhibidor farmacológico específico de MMP-2 (no se muestra). En su conjunto, estos datos indican que CTX retiene la capacidad de unión específica a MMP tras la conjugación con Cy5.5.

### 20 EJEMPLO 3

#### OBTENCIÓN DE IMAGEN IN VIVO CON UN CONJUGADO DE CLOROTOXINA REPRESENTATIVO: CTX: Cy5.5

**[0080]** Modelos animales. Se llevaron a cabo todos los estudios en ratón según los protocolos aprobados por la IACUC. Se establecieron xenoinjertos subcutáneos en ratones nu/nu (desprovistos de pelo) usando una línea de células 9L de gliosarcoma de rata (ATCC), y RH30, una línea celular de rabdomiosarcoma. Se establecieron los xenoinjertos usando 1 millón de células 9L o RH30 suspendidas en medios exentos de suero y Matrigel a una relación 1:1. Se establecieron xenoinjertos intracraneales mediante inyección estereotáxica de 1 millón de células 9L suspendidas en 10 µl de PBS a 3 mm del cerebro lateral y posterior con respecto al bregma. Los ratones ND2: SmoA1 con meduloblastoma, los ratones TRAMP con cáncer de próstata y los ratones Apc<sup>T638N</sup> con adenoma intestinal y adenocarcinoma fueron como se ha descrito anteriormente. Véanse, Fodde, R., y col., A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994. 91(19): p. 8969-73; Greenberg, N.M., y col., Prostate cancer in a transgenic mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1995. 92(8): p. 3439-43; Kaplan-Lefko, P.J., y col., Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. Prostate, 2003. 55(3): p. 219-37.; Hallahan, A.R., y col., The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. Cancer Res., 2004. 64(21): p. 7794-800;

**[0081]** Procedimientos de obtención de imagen in vivo. Se administró CTX: Cy5.5 (0,1 – 0,2 ml de 10-20 µM) intravenosamente mediante inyección en la vena de la cola. Se obtuvieron imágenes biofotónicas en el sistema Xenogen IVIS (Alameda, CA). Se anestesiaron los ratones con 1 a 2,5% de isoflurano (Abbott Labs, IL) antes de colocarse en la cámara de obtención de imagen y de formarse imágenes en diversos momentos temporales después de la inyección. Se diseccionaron los órganos y tumores relevantes de algunos de los animales y se obtuvieron imágenes con fluorescencia inmediatamente después de la disección. En el curso temporal de los experimentos, se capturaron todas las imágenes usando configuraciones idénticas del sistema y se normalizó la emisión de la fluorescencia a fotones por segundo por centímetro cuadrado por estereorradián (p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Se repitieron todos los experimentos múltiples veces y se muestran imágenes representativas en las figuras.

**[0082]** La actividad in vivo de CTX: Cy5.5 en ratones con xenoinjertos de células 9L de glioma. Tras la inyección en la vena de la cola de 0,1 ml de conjugado 10 µM, el conjugado se distribuyó rápidamente a través del cuerpo. En todos los momentos temporales, la emisión NIR fue mayor en los xenoinjertos que el tejido circundante. Se observó la unión específica a células de glioma hasta 32 días después de la inyección en la vena de la cola, que fue sustancialmente más larga que la observada en el resto del cuerpo (4-5 días) (FIGURA 2C). Los xenoinjertos cerebrales mostraron una clara distinción entre el cerebro con tumor y el normal en condiciones que se pueden reproducir en quirófanos operativos para seres humanos (FIGURA 2D). El análisis histológico confirmó la invasión del glioma en el cerebro de los ratones xenoinjertados, pero no de los controles (FIGURA 2E). La unión específica de CTX: Cy5.5 fue seis veces inferior cuando los ratones se pretrataron con el bloqueante de MMP-2, 1,10-fenantrolina, indicando que la obtención de imagen reflejó la unión de CTX: Cy5.5 a las células tumorales en lugar de simplemente medir el aumento del flujo sanguíneo en los tumores neovascularizados (FIGURA 2F).

5 **[0083] Obtención de imagen no invasiva de meduloblastoma a través del hueso del cráneo.** Se probó CTX: Cy5.5 en un modelo de ratón autoinjertado con meduloblastoma genéticamente preciso. En estos ratones, los meduloblastomas surgen en el cerebelo debido a la expresión transgénica de un alisado constitutivamente activo, un mediador de la actividad de sonic hedgehog. En estos ratones, se detectaron los tumores a través del cráneo y el pericráneo intactos y se correlacionó el nivel de emisión de NIR con el tamaño de cada tumor (FIGURAS 3A-D y no se muestra). Debido a que estos tumores surgen en ausencia de rotura quirúrgica de la barrera hematoencefálica, se concluyó que CTX: Cy5.5 penetra en el tejido de meduloblastoma de ratón a concentraciones adecuadas para la obtención de imagen en tiempo real y que los tumores intracraneales se pueden detectar fácilmente de manera no  
10 invasiva.

15 **[0084] Obtención de imagen en tejido de próstata.** Se recogieron muestras de tejido de próstata humana normal y cancerosa y se manipularon según los protocolos para Sujetos Humanos aprobados por el IRB. Se incubaron las secciones con un conjugado de CTX: Cy5.5 1  $\mu$ M en tampón de suero de cabra normal al 5% durante 45 minutos. Se redujo el conjugado no unido mediante lavado de los portas 3 veces durante 5 minutos en tampón PBS. Se detectó la señal mediante microscopía de fluorescencia y se correlacionaron con las secciones adyacentes teñidas con hematoxilina y eosina (HyE).

20 **[0085]** Para los experimentos en ratón, se fijaron los tejidos en paraformaldehído al 4% preparado recientemente y se tiñeron con HyE por el protocolo de laboratorio clínico normalizado. Se llevó a cabo la microscopía confocal en un microscopio Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, NY) usando unos anchos de línea de láser HeNe a 633 nm para la excitación y un filtro de paso de banda a 650-710 nm para la recogida de la emisión a través de un sistema de captura mediante tubo fotomultiplicador. Se tradujo la señal NIR en pseudocolor rojo para permitir la detección en el espectro visible.  
25

30 **[0086] Imágenes de cáncer de próstata autoinjertado y de metástasis.** Se expresó MMP-2 por cánceres que se desarrollaban de diversos sitios de órganos, aunque se ha evaluado únicamente la unión a clorotoxina en tumores neuroectodérmicos. Para determinar si CTX marca las células de cáncer de próstata, se comparó la unión de CTX: Cy5.5 a las secciones de cáncer de próstata humano quirúrgicamente derivado con epitelio de próstata no neoplásico. No se observó unión específica en tejido de próstata normal, mientras que se observaron elevados niveles de CTX: Cy5.5 en islas de células cancerosas (FIGURA 4A). Las secciones adyacentes desvelaron una perfecta correlación entre los restos de células cancerosas detectadas mediante CTX: Cy5.5 y la tinción histológica patrón (FIGURA 4A).

35 **[0087] Modelo GEM de cáncer de próstata.** Los resultados de la unión de CTX: Cy5.5 a las secciones de cáncer de próstata humano conducen a la evaluación del conjugado en un modelo GEM de cáncer de próstata. En ratones transgénicos que expresan el gen SV40T en epitelio de próstata, CTX: Cy5.5 iluminó el cáncer de próstata primario así como la metástasis pulmonar y linfática (FIGURAS 4B-D). La unión de CTX: Cy5.5 estaba correlacionada con la presencia histológica de células neoplásicas en órganos primarios y distantes (FIGURA 4C). Se detectaron fácilmente foci microscópicos de células cancerosas en los canales linfáticos y en los nódulos linfáticos (FIGURAS 4D-E).  
40

45 **[0088] Unión de CTX: Cy5.5 en adenocarcinoma y sarcoma.** Para evaluar adicionalmente el espectro del cáncer que se puede diagnosticar por imagen mediante CTX: Cy5.5, se evaluó la emisión NIR en un modelo GEM de poliposis adenomatosa familiar (FAP), el ratón *Apc*<sup>1638N</sup>, y en un modelo de sarcoma xenoinjertado. En ratones *Apc*<sup>1638N</sup> podrían no resolverse los neoplasmas intestinales mediante obtención de imagen no invasiva debido a la autofluorescencia de los contenidos intestinales. El análisis ex vivo del intestino que estaba libre de contenidos intestinales mostró una exquisita delineación de nódulos cancerosos de 3-5 mm de diámetro y no hubo de otra manera señal apreciable del intestino normal (FIGURAS 5A-C). Los análisis microscópicos del xenoinjerto de rhabdomiocarcinoma mostraron que virtualmente, cada célula cancerosa estaba brillantemente iluminada por CTX: Cy5.5 (FIGURAS 5D-F).  
50

55 **[0089]** Biodistribución y toxicidad. Se han administrado anteriormente CTX y Cy5.5 a pacientes humanos en ensayos clínicos, pero las propiedades farmacocinéticas del conjugado no se han estudiado previamente. Se distribuyeron débilmente con regularidad conjugados no unidos a través del cuerpo del ratón durante las primeras 24-96 horas, con la excepción de que la emisión NIR procedente del riñón fue mucho mayor que la de cualquier otro órgano. La microscopía confocal mostró que CTX: Cy5.5 se concentró en el sistema colector renal según se esperaba para un compuesto que se excreta principalmente en orina. No se mostró otro órgano para la unión específica de CTX: Cy5.5.

**[0090]** Se informó anteriormente de que CTX reducía la actividad locomotora en ratones. En este estudio, los ratones que se inyectaron con CTX fueron indistinguibles de los ratones del control en una observación de campo abierto. Para evaluar adicionalmente la toxicidad potencial de CTX a las dosis usadas para la obtención de imagen óptica, se llevó a cabo una necropsia completa en los ratones de dos semanas tras la exposición a CTX. El cerebro, el corazón, los pulmones, los riñones, el hígado, el bazo y la piel fueron indistinguibles de los ratones del control (no se muestra). La evaluación de laboratorio no mostró alteración en el hematocrito, el recuento plaquetario, el recuento de glóbulos blancos, los electrolitos, la función hepática o la función renal (no se muestra). A las dosis usadas para la obtención de imagen óptica, no se podría detectar toxicidad en ratones.

#### EJEMPLO 4

##### IMPLICACIÓN DE MMP-2 EN LA UNIÓN DEL CONJUGADO DE CLOROTOXINA

**[0091]** Se describe en este ejemplo la implicación de MMP-2 en la unión del conjugado de clorotoxina.

**[0092]** Se informó anteriormente que las células de meduloblastoma no expresan MMP-2. Según se describe en el presente documento, se observó la unión de un conjugado de clorotoxina representativo de la invención (CTX: Cy5.5) en tumores de meduloblastoma de ratón y secciones histológicas de meduloblastoma humano. Esto aumentó la posibilidad de que MMP-2 no fuera la diana de CTX: Cy5.5, a pesar de un informe previamente publicado de que CTX se une a MMP-2.

**[0093]** Se analizó la actividad de MMP-2 mediante los ensayos de la gelatinasa. Los ensayos de la gelatinasa detectan también la actividad de MMP-9. Estos análisis mostraron que todos los tumores que se unían a CTX: Cy5.5 expresaban MMP-2 y MMP-9 y que los tumores autoinjetados en meduloblastoma genomanipulado y modelos de cáncer de próstata expresan también MMP-2, pero no MMP-9 (véase la FIGURA 11) El tejido no neoplásico de los ratones no muestra actividad MMP-2 o MMP-9. Este experimento mostró que MMP-2 se expresaba en tejidos que se unían a CTX: Cy5.5, pero no a tejidos no neoplásicos que mostraban únicamente una unión de CTX: Cy5.5 de fondo.

**[0094]** Los inhibidores farmacológicos de MMP-2 redujeron la unión de CTX: Cy5.5 en experimentos in vitro e in vivo sugiriendo que MMP-2 puede ser importante para la unión de CTX: Cy5.5 (véase la FIGURA 2F y no se muestra). Para determinar, además, definitivamente, si MMP-2 estaba implicado en la unión de CTX: Cy5.5, se adoptó un enfoque genético. Se transfectoron células MCF-7, que expresaban mínimamente MMP-2 y mínimamente la unión de CTX: Cy5.5 (véanse las FIGURAS 11 y 8) con un plásmido que codificaba MMP-2. Tras la transfección, las células expresaron elevados niveles de MMP-2 según se muestra en verde en la FIGURA 8. Además, se transfectoron células MCF-7 con MMP-2-plásmido pero no se transfectoron con plásmido del control unido a elevados niveles de CTX: Cy5.5 y se localizó mucho esta señal con la tinción de MMP-2. Esto demuestra claramente que MMP-2 es importante para la unión de CTX: Cy5.5.

**[0095]** Las observaciones aumentaron la posibilidad de que MMP-2 pueda no ser la diana celular en última instancia de CTX: Cy5.5. En primer lugar, los experimentos en células 9L de glioma mostraron una relativamente mala localización simultánea de la unión de CTX: Cy5.5 y la tinción inmunofluorescente de MMP-2. Es posible que este resultado sea debido al impedimento estérico entre CTX: Cy5.5 y el anticuerpo contra MMP-2 o que MMP-2 intracelular no fuera la diana en última instancia de CTX: Cy5.5. Además, existió desacuerdo entre la cantidad de unión de CTX: Cy5.5 en las células y la cantidad de MMP-2 expresada en las células. Por ejemplo, el glioma con células 9L y el glioma con células U87 mostraron ambos elevados niveles de unión a CTX: Cy5.5, 9L tuvo todavía una baja actividad de MMP-2 y U87 tuvo unos niveles mucho mayores de actividad de MMP-2 en los ensayos de la gelatinasa (véase la FIGURA 12). Los inventores evaluaron adicionalmente los niveles de MMP-2 y MMP-9 en los medios precedentes de las células. La cantidad de unión a CTX: Cy5.5 de las células en el cultivo correspondió mucho mejor a los niveles de actividad de MMP-2 en los medios que fueron altos en células 9L y U87, pero bajos en células MCF7 (véase la FIGURA 12)

**[0096]** Se ha teorizado que la forma secretada de MMP-2 fue más importante para la unión a CTX: Cy5.5 de las células que la forma intracelular. Para probar esto, los inventores compararon la unión a CTX: Cy5.5 en células MCF7 y HeLa en las tres siguientes condiciones. En la Condición (1) se añadió directamente CTX: Cy5.5 a los medios de MCF7 o HeLa y se incubó durante 24 horas en condiciones que dieron como resultado una elevada unión a CTX: Cy5.5 de las células 9L o U87. Hubo una mínima tinción de las células MCF7 o HeLa en estas condiciones. En la Condición (2) se añadió la misma cantidad de CTX: Cy5.5 a los medios de las células 9L o U87, se incubó durante 24 horas, a continuación se transfirió a células MCF7 o HeLa. Cuando se usaron los medios acondicionados

de cualquiera de las células 9L o U87 para la tinción, las células MCF7 y HeLa se tiñeron brillantemente por CTX: Cy5.5 (véase la FIGURA 13). Debido a que la cantidad de MMP2 no cambia en células MCF7 o HeLa debido a la presencia de medios acondicionados, CTX: Cy5.5 se unen en última instancia a una diana diferente de MMP-2. Existen dos posibilidades principales que se están estudiando actualmente: (1) MMP-2 altera enzimáticamente CTX: Cy5.5 de tal manera que gana afinidad por otra célula diana; o (2) MMP-2 altera enzimáticamente la(s) molécula(s) en células MCF7 o HeLa e tal manera que gana afinidad por CTX: Cy5.5.

**[0097]** De cualquier manera, se demostró que MMP-2 era importante para la unión de CTX: Cy5.5, pero puede no ser la última diana celular de CTX: Cy5.5.

**[0098]** Se observó que CTX: Cy5.5 se unía a una banda que migraba rápidamente en los análisis Western que fue consistente con una banda de fosfolípidos. Esto aumentó la posibilidad de que CTX: Cy5.5 se unieran a un fosfolípido. Los inventores resolvieron los fosfolípidos de 4 líneas celulares así como los patrones de fosfolípidos purificados apropiados mediante cromatografía en capa fina (TLC). A continuación se tiñeron las placas de TLC con CTX: Cy5.5. Esto mostró definitivamente que la esfingomielina y la fosfatidilcolina, pero no el bifosfato de fosfoinositol u otros fosfolípidos fueron capaces de unirse a CTX: Cy5.5 (véase la FIGURA 9).

**[0099]** La esfingomielina y la fosfatidilcolina están presentes en todas las células y únicamente un subconjunto de células MCF7 y HeLa tratadas con medios acondicionados con CTX: Cy5.5 procedentes de células 9L y U87 mostraron niveles elevados de señal.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un conjugado de clorotoxina constituido por uno o más restos Cy5.5 acoplados covalentemente a una clorotoxina.
2. El conjugado de la Reivindicación 1, en el que la clorotoxina se selecciona entre el grupo constituido por clorotoxina natural, clorotoxina sintética, y clorotoxina recombinante.
- 10 3. El conjugado de la Reivindicación 1, en el que el conjugado comprende entre 1 y 3 restos Cy5.5.
4. El conjugado de la Reivindicación 1, en el que el conjugado comprende 1 resto Cy5.5.
- 15 5. Una composición que comprende un conjugado de clorotoxina según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho conjugado es adecuado para la administración a un ser humano.
6. Un procedimiento *in vitro* para diferenciar foci de cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina del tejido no neoplásico, que comprende:
- 20 (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 y que tiene afinidad y especificidad por células que expresan sitios de unión a clorotoxina;
- (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina;
- 25 en el que un elevado nivel de unión, con respecto al tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.
7. Un procedimiento *in vitro* para detectar cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina, que comprende:
- 30 (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 y que tiene afinidad y especificidad por células que expresan sitios de unión a clorotoxina; y
- (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina;
- en el que un elevado nivel de unión, con respecto al tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.
- 35 8. Un procedimiento *in vitro* para detectar células que expresan el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2), que comprende:
- (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 40 1-4 y que tiene afinidad y especificidad por el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2); y
- (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina;
- 45 en el que un elevado nivel de unión, con respecto al tejido normal, es indicativo de la presencia de un tumor que expresa el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2).
9. Un procedimiento *in vitro* para determinar la localización en un paciente de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina, que comprende;
- 50 medir mediante obtención de imagen de fluorescencia el nivel de unión de un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 en una muestra obtenida del paciente intraquirúrgicamente, para determinar la localización de las células cancerosa que expresan sitios de unión a clorotoxina,
- en el que un elevado nivel de unión, con respecto al tejido normal, es indicativo de la presencia de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina.
- 55 10. Un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 o una composición según la Reivindicación 5, para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina.
11. Un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 o una composición según la



Reivindicación 5, para uso en el tratamiento de un tumor que expresa el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2).

5 12. Un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 o una composición según la Reivindicación 5, para uso en la inhibición de la actividad invasiva de células que expresan sitios de unión a clorotoxina.

10 13. Un conjugado de clorotoxina según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 o una composición según la Reivindicación 5, para uso en:

(i) la diferenciación de foci de cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina procedentes de tejido no neoplásico;

15 (ii) la detección de cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina; o

(iii) la determinación de la localización de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina en un paciente intraquirúrgicamente.

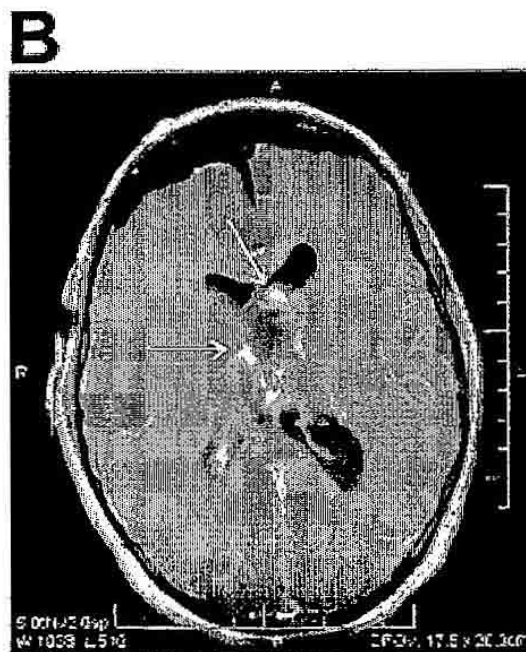
20 14. Los procedimientos de las Reivindicaciones 6, 7 o 9, o el conjugado o la composición de clorotoxina para uso según las Reivindicaciones 10, 12 o 13, en el que el cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina se selecciona entre gliomas, astrocitomas, meduloblastomas, carcinomas del plexo coroideo, ependimomas, tumores cerebrales, neuroblastomas, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres de intestino, cánceres de páncreas, cánceres de hígado, cánceres de riñón, sarcomas, osteosarcomas, rhabdomyosarcomas, sarcoma de Ewing, carcinomas, melanomas, cánceres de ovarios, cánceres cervicales, cánceres colorrectales, 25 cánceres endometriales, tumores de células germinales, cánceres de laringe, mielomas múltiples, cánceres de próstata, retinoblastomas, cánceres gástricos, cánceres de testículos, y tumor de Wilm.

30 15. Los procedimientos de las Reivindicaciones 6, 7 o 9, o el conjugado o composición de clorotoxina para uso según las Reivindicaciones 10, 12 o 13, en el que el cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina se selecciona entre gliomas, meduloblastomas, sarcomas, cáncer de próstata, y cáncer de intestino.

35 16. Un conjugado de clorotoxina según cualquiera de la Reivindicaciones 1-4 o una composición según la Reivindicación 5, para uso en la detección de células que expresan el complejo de proteína de la metaloproteínasa de matriz (MMP-2).



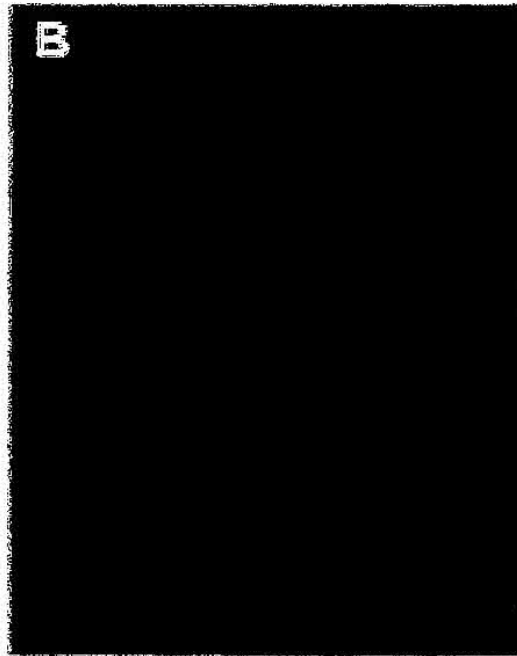
**FIGURA 1A.**



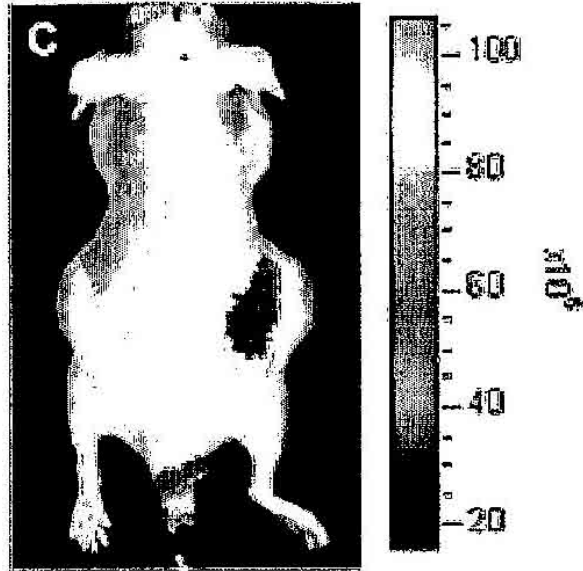
**FIGURA 1B.**



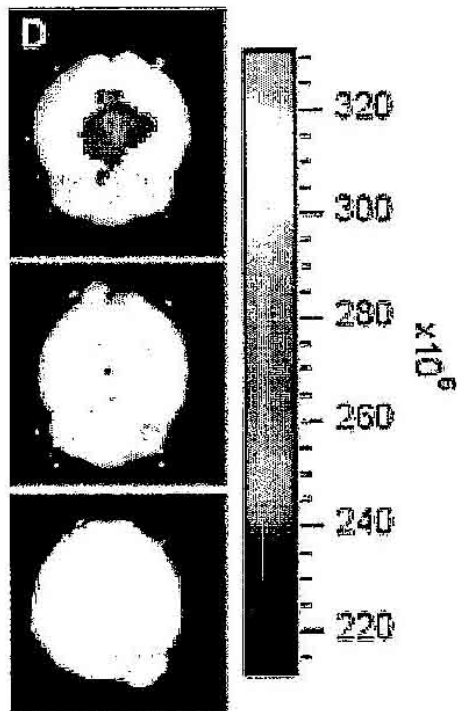
**FIGURA 2A.**



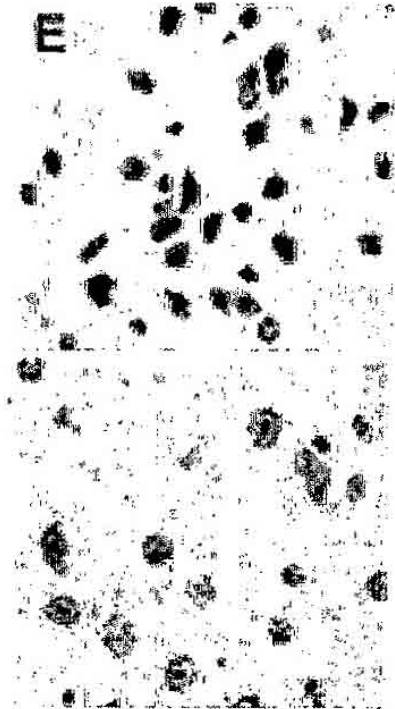
**FIGURA 2B.**



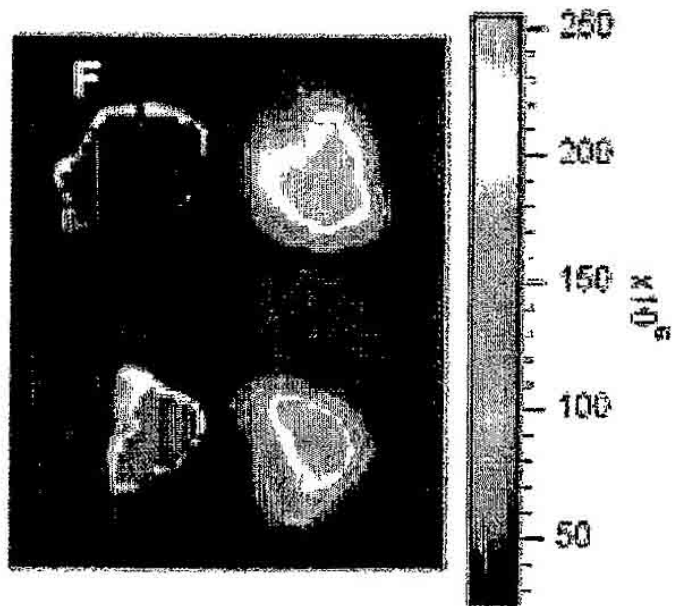
**FIGURA 2C.**



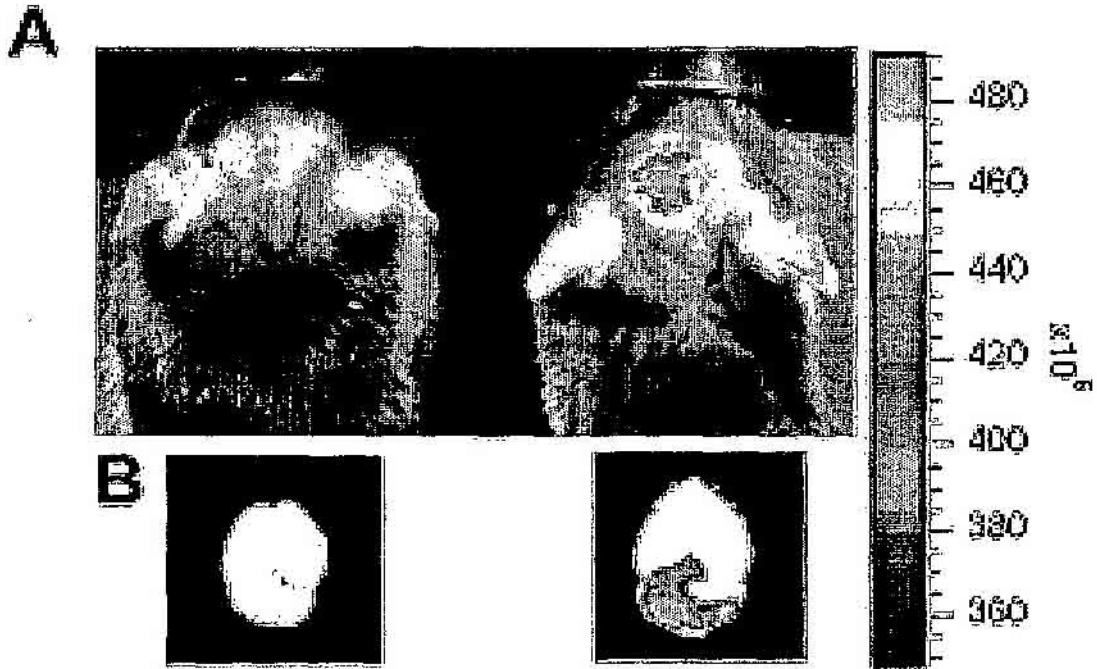
**FIGURA 2D.**



**FIGURA 2E.**

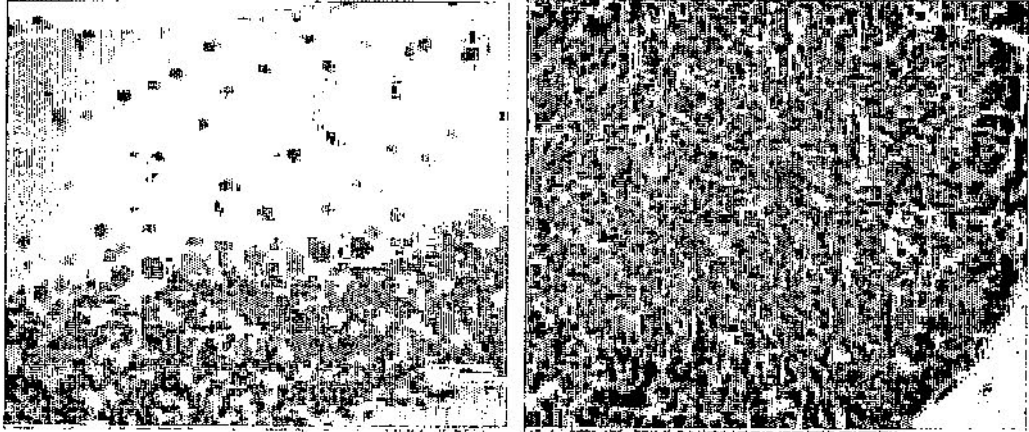


**FIGURA 2F.**



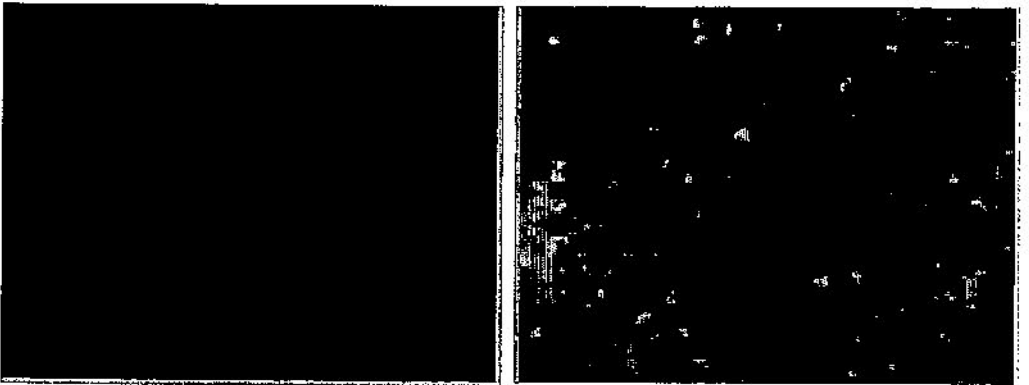
**FIGURA 3A Y 3B.**

**C**

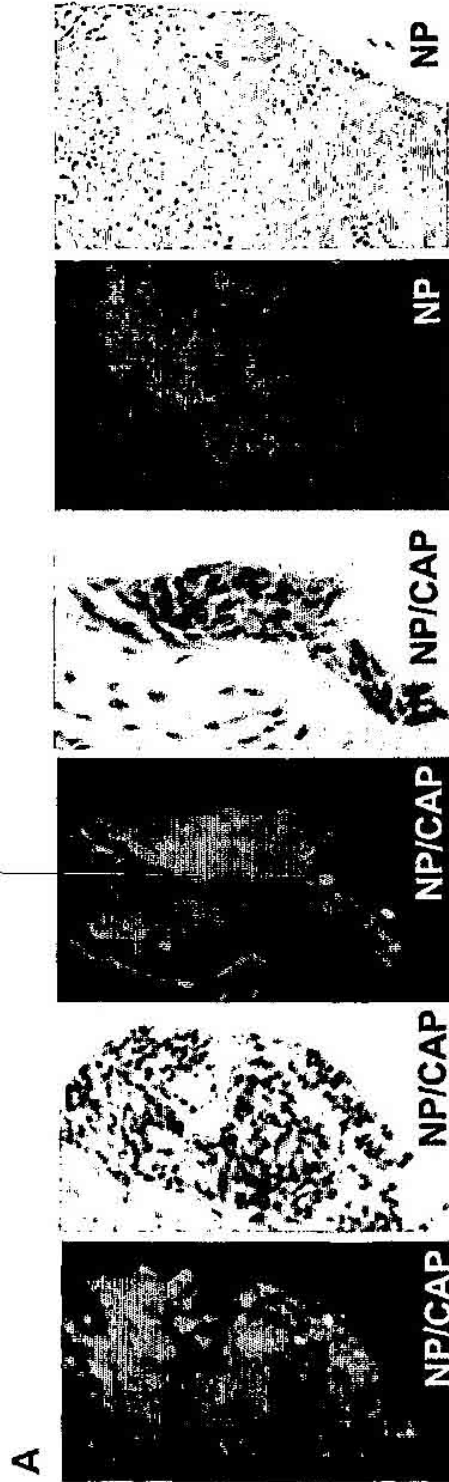


**FIGURA 3C.**

**D**

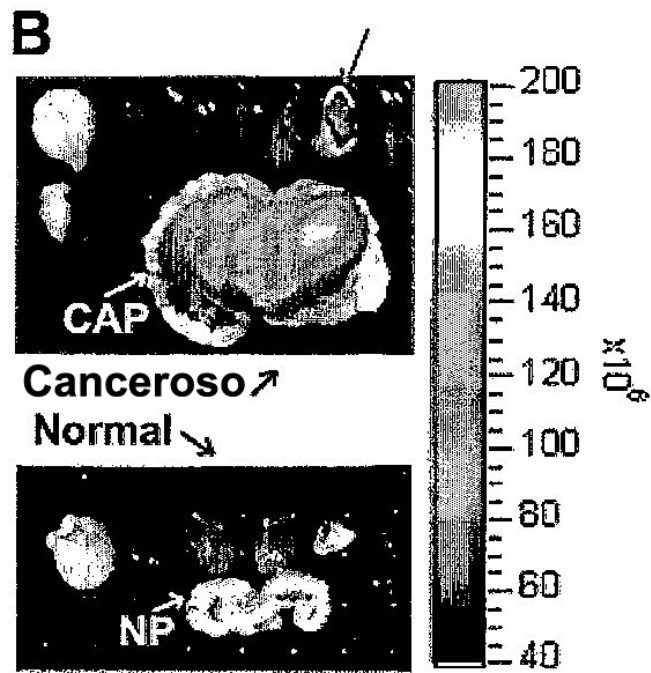


**FIGURA 3D.**

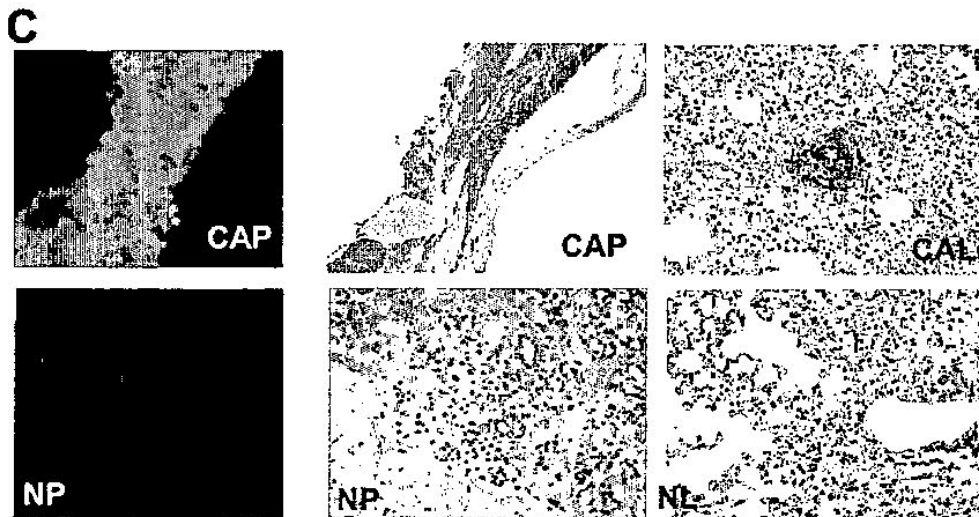


**FIGURA 4A.**

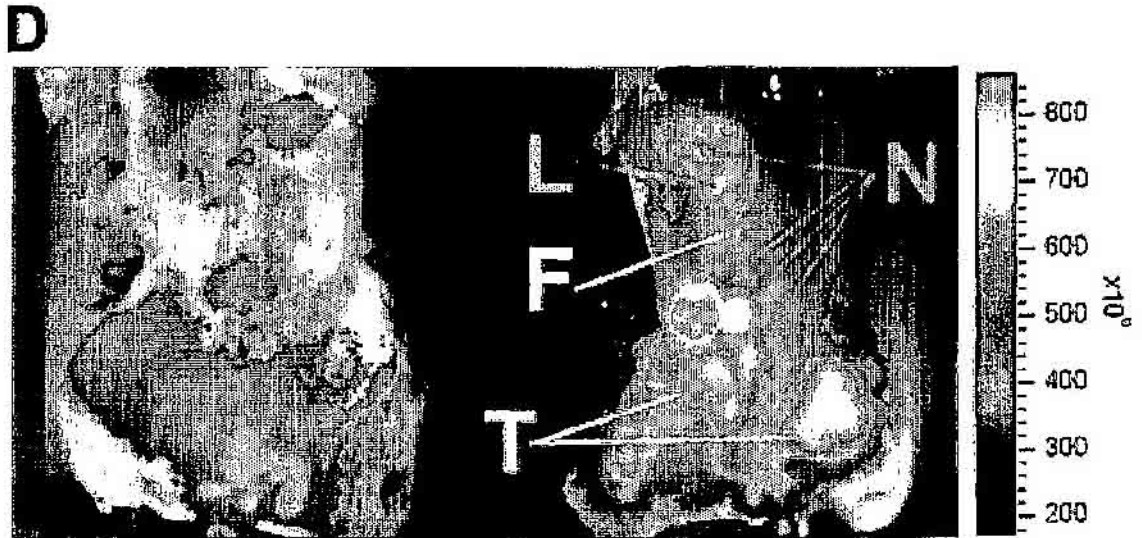




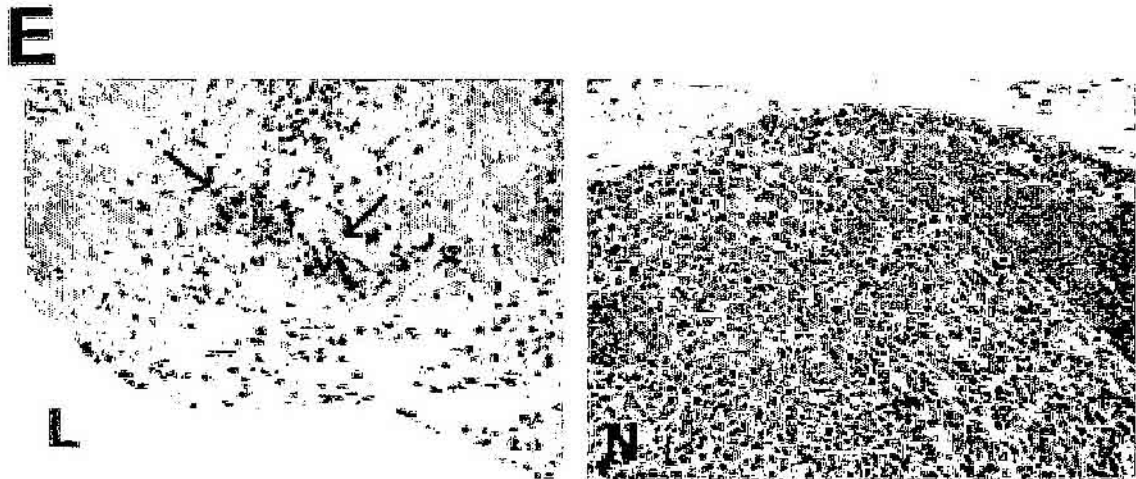
**FIGURA 4B.**



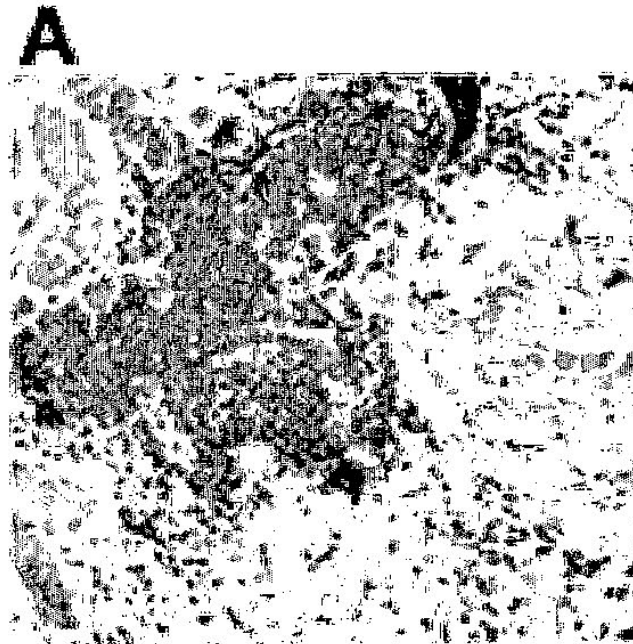
**FIGURA 4C.**



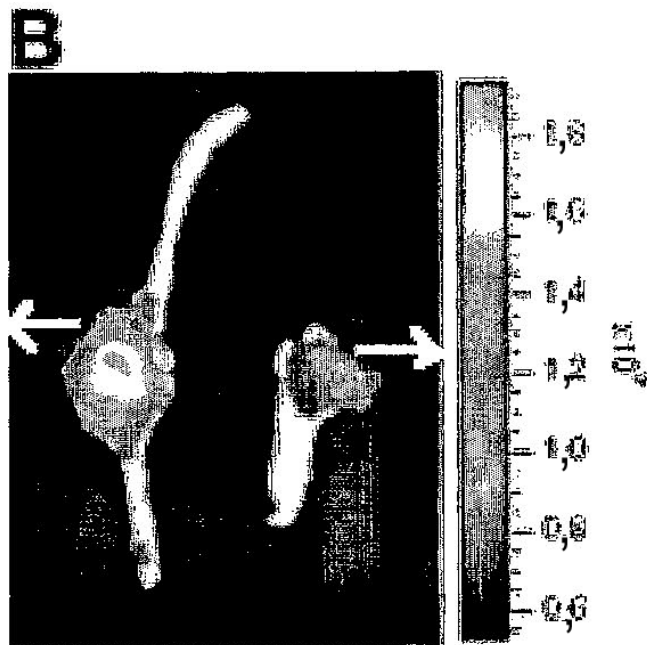
**FIGURA 4D.**



**FIGURA 4E.**

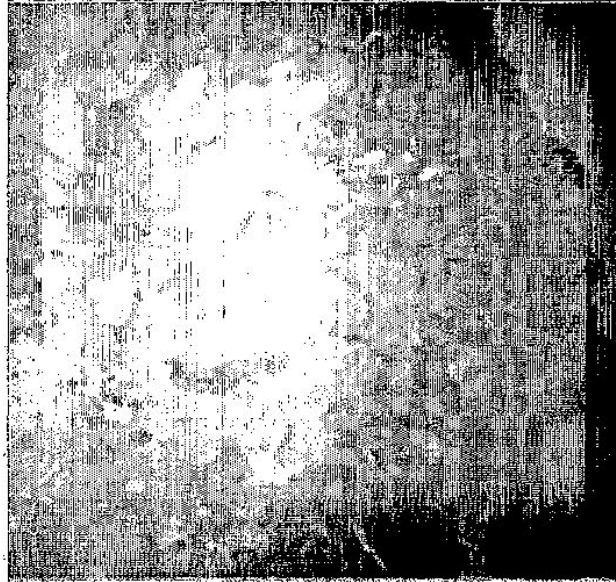


**FIGURA 5A.**



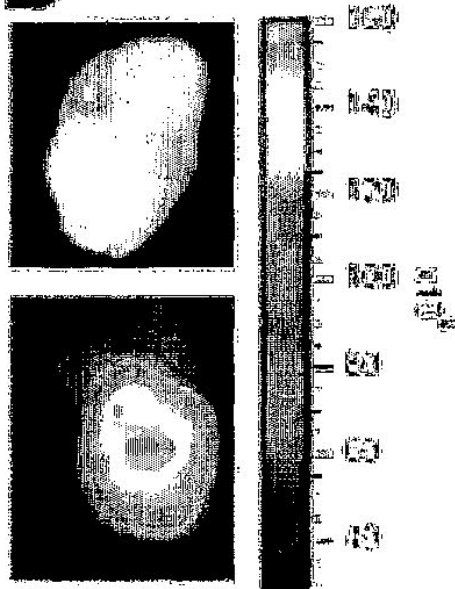
**FIGURA 5B.**

**C**



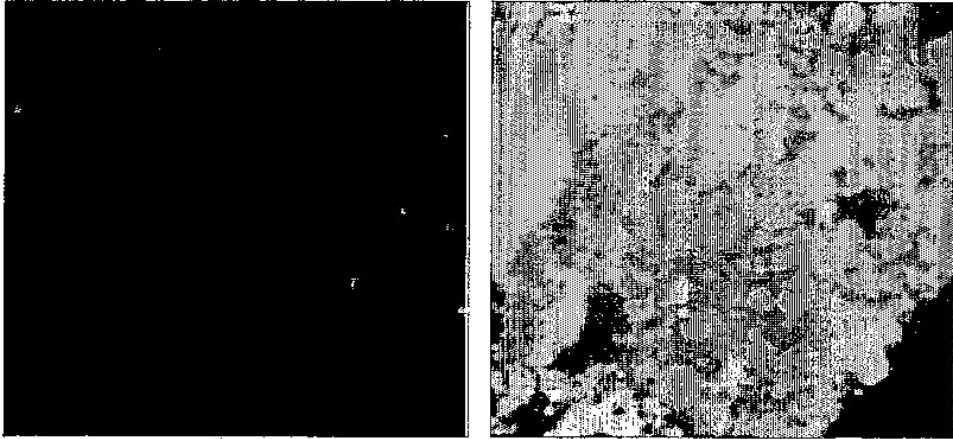
**FIGURA 5C.**

**D**



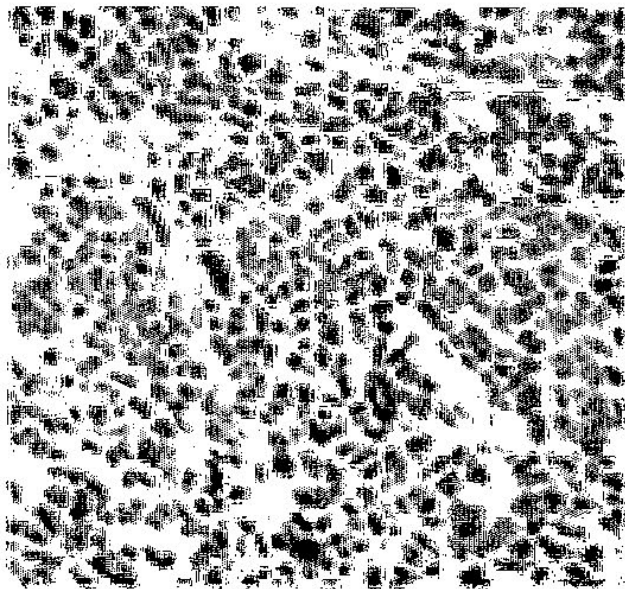
**FIGURA 5D.**

**E**

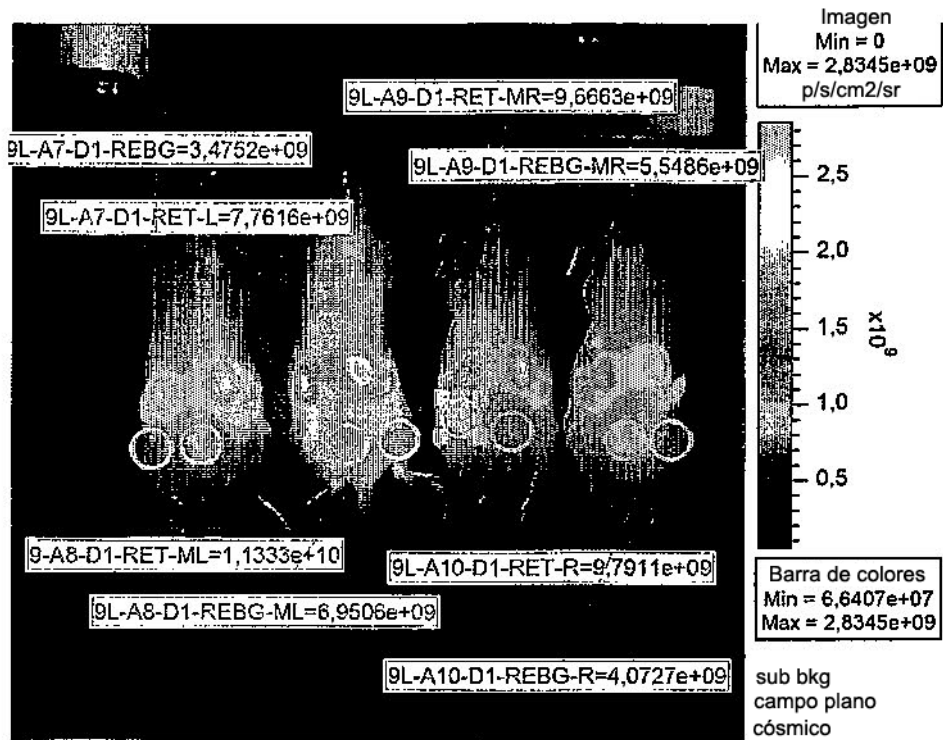


**FIGURA 5E.**

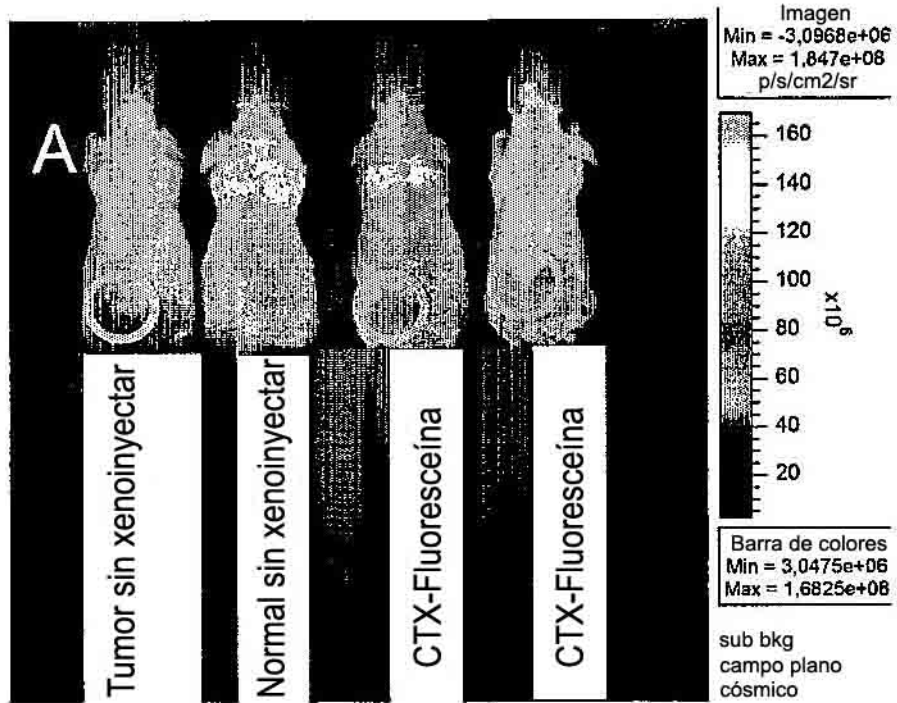
**F**



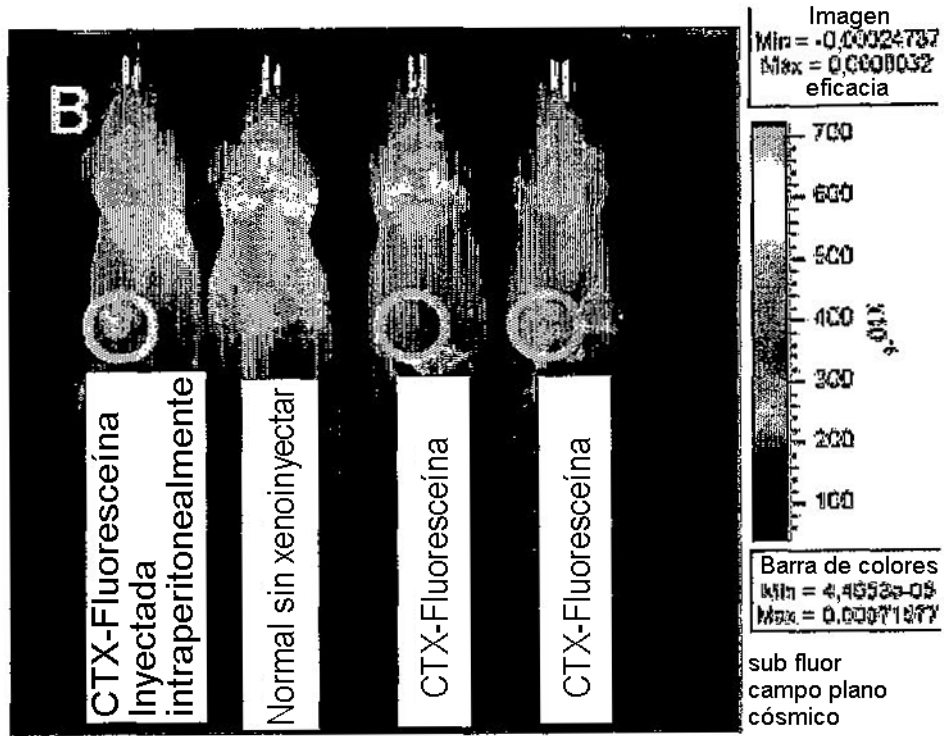
**FIGURA 5F.**



**FIGURA 6.**

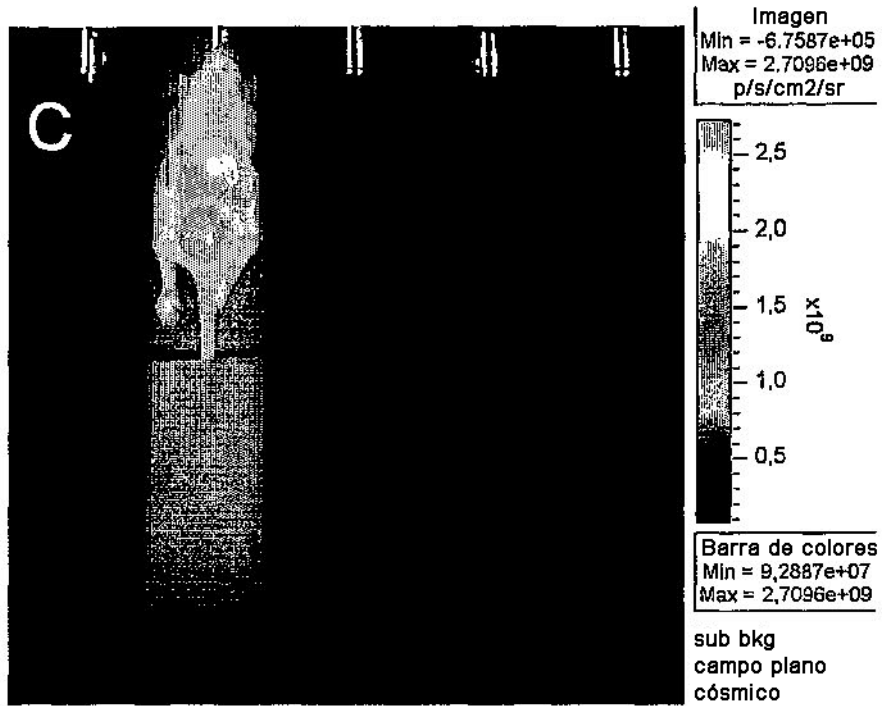


**FIGURA 7A.**

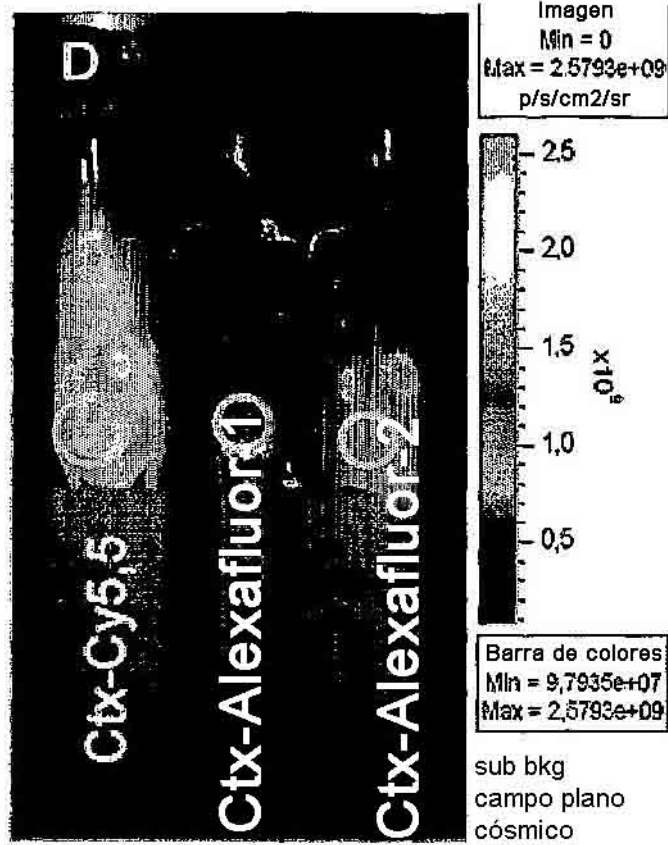


**FIGURA 7B.**

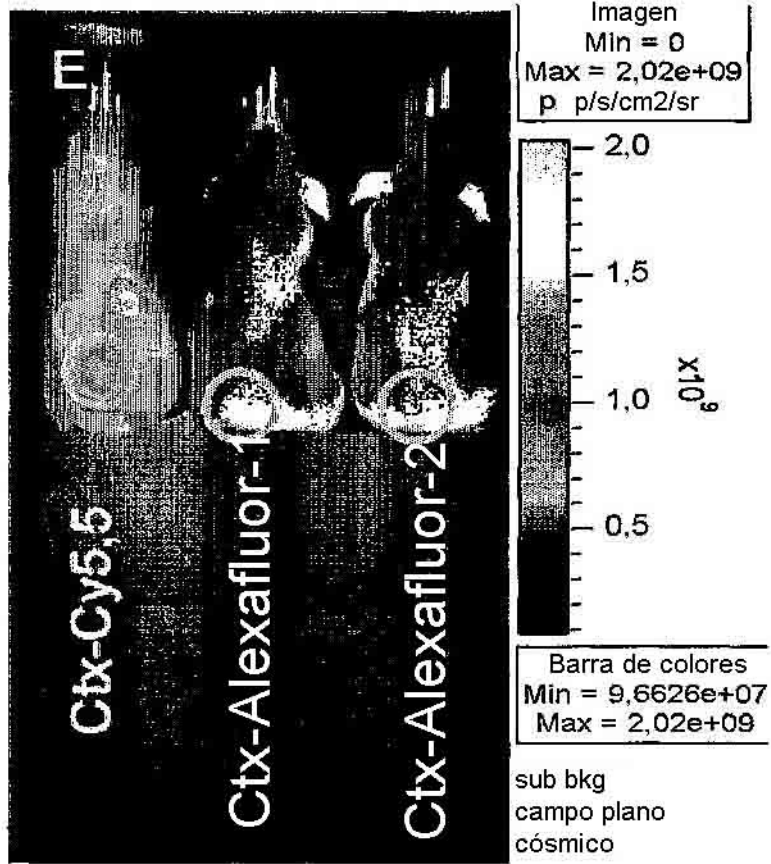




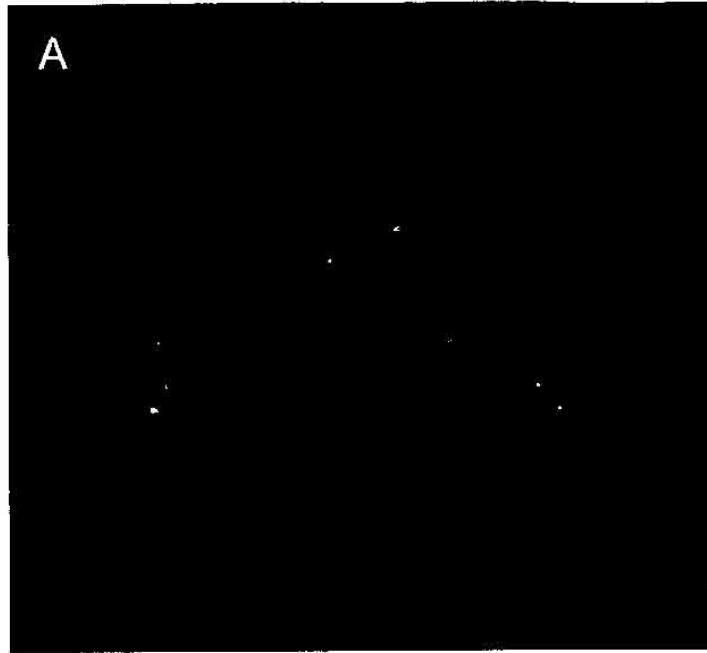
**FIGURA 7C.**



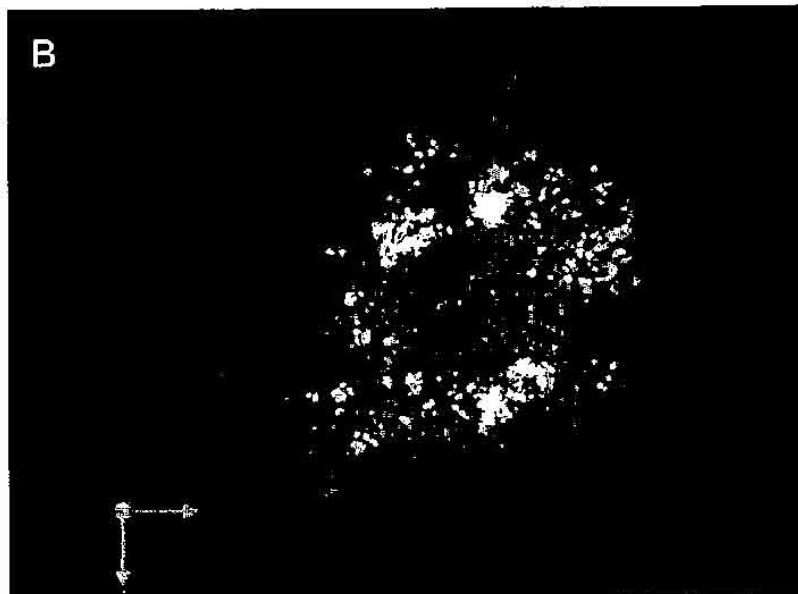
**FIGURA 7D.**



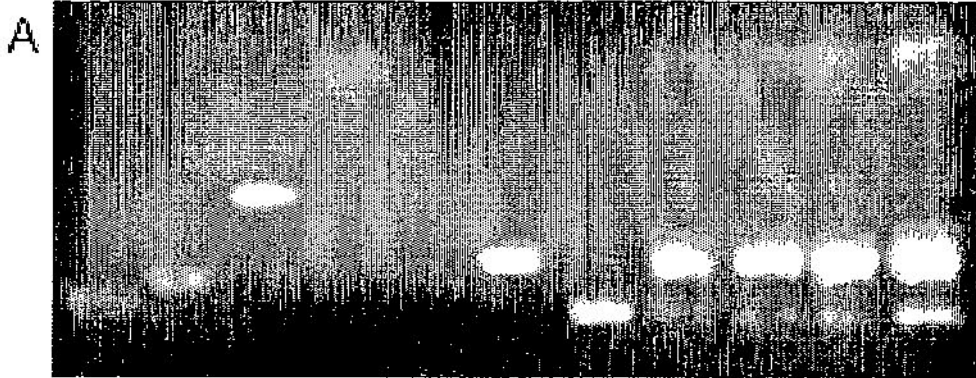
**FIGURA 7E.**



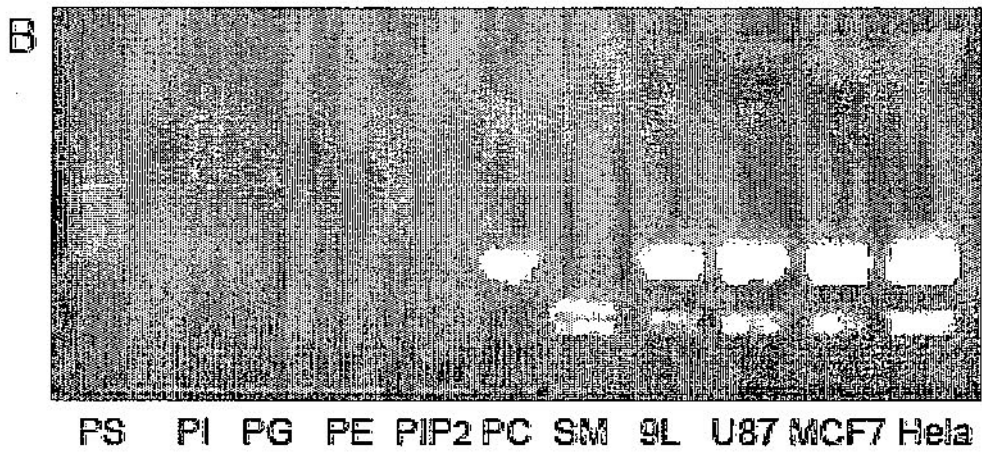
**FIGURA 8A.**



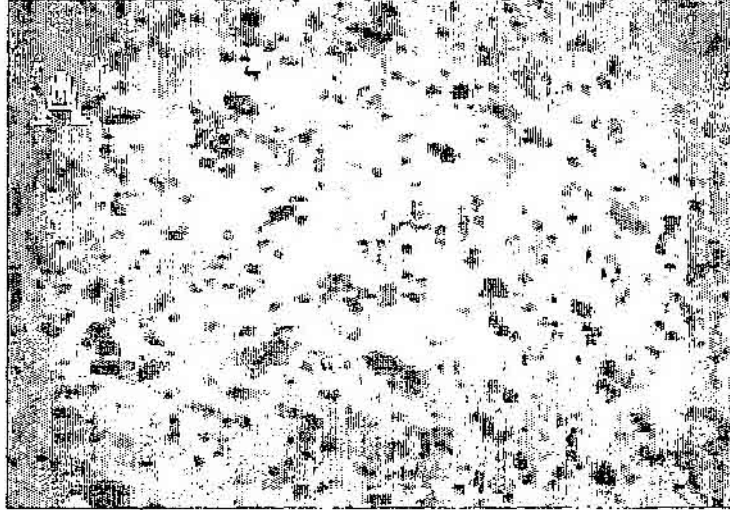
**FIGURA 8B.**



**FIGURA 9A.**



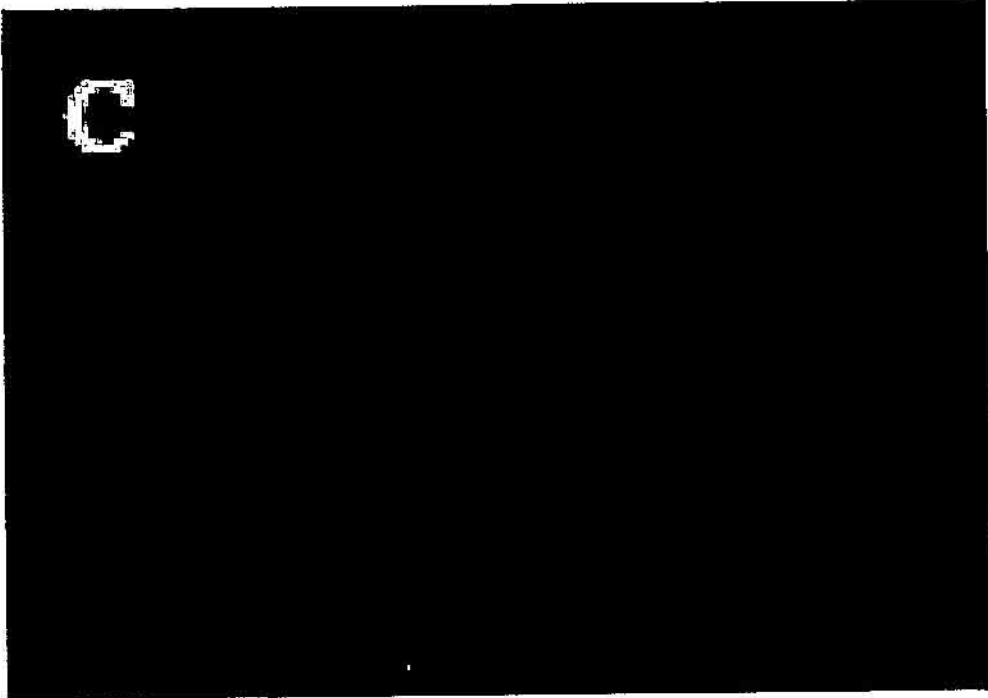
**FIGURA 9B.**



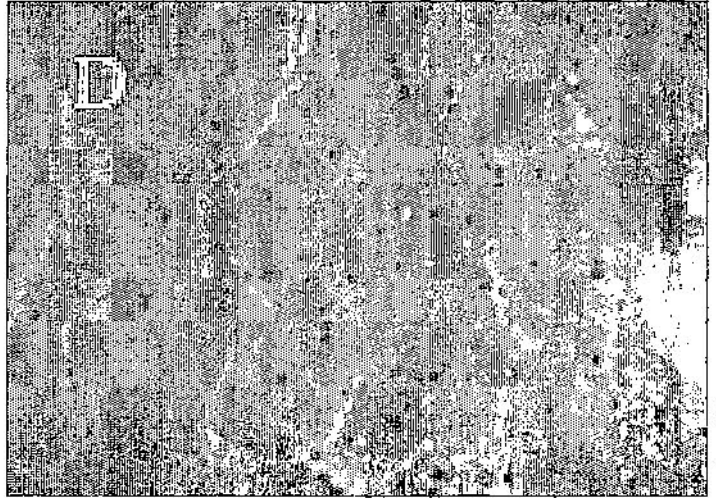
**FIGURA 10A.**



**FIGURA 10B.**



**FIGURA 10C.**



**FIGURA 10D.**

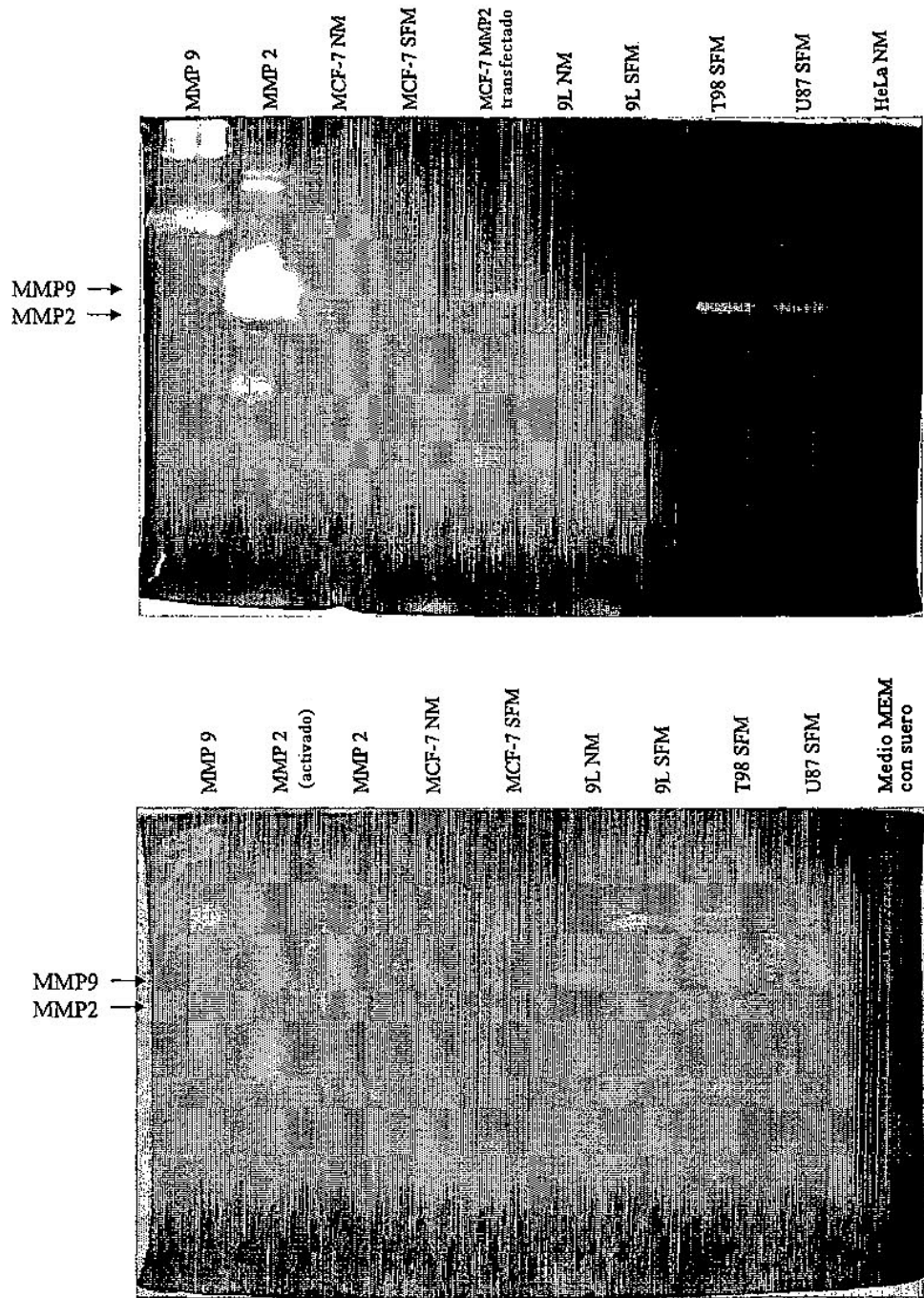


**FIGURA 10E.**

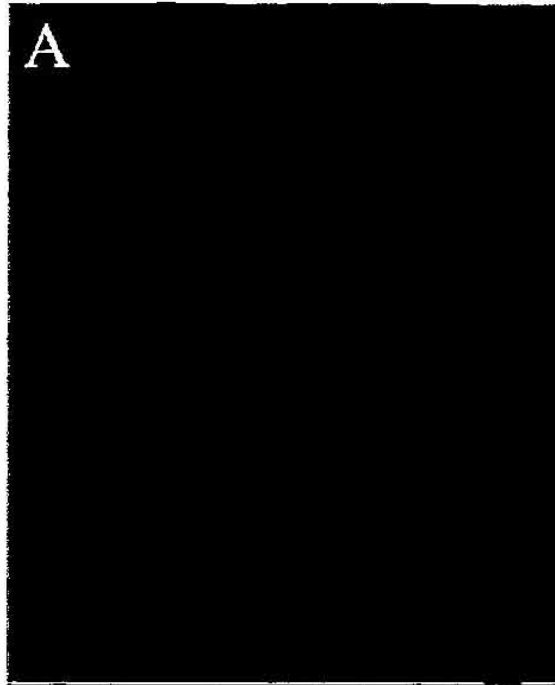


	MMP-2	MMP-9	
Xenoinjerto – 9L	+	-	
Xenoinjerto – D283	+	-	
Xenoinjerto – RH30	+	-	
Tumor de próstata	+	+	
Próstata normal – Ant	-	-	
Próstata normal – DVL	-	-	
Tumor en nódulo	+	-	
Tumor SmoA1	+	+	niveles bajos
Tumor SmoA1	+	+	niveles bajos
Tumor SmoA1	+	+	niveles bajos
Tumor SmoA1	+	+	niveles bajos
Cerebelo normal	-	-	

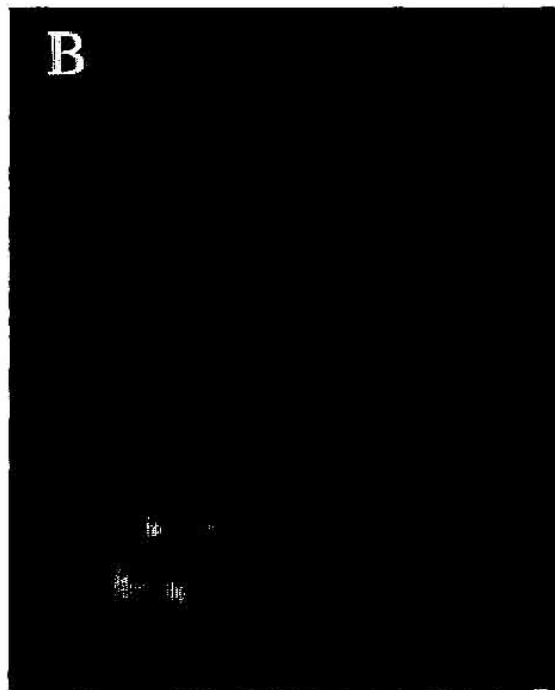
**FIGURA 11.**



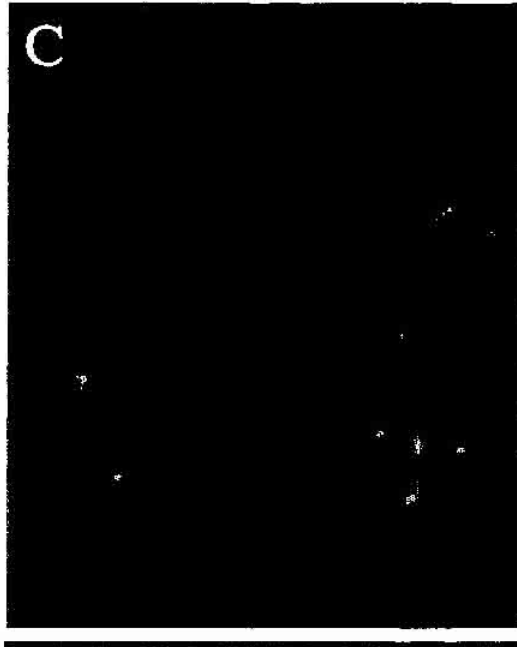
**FIGURA 12.**



**FIGURA 13A.**



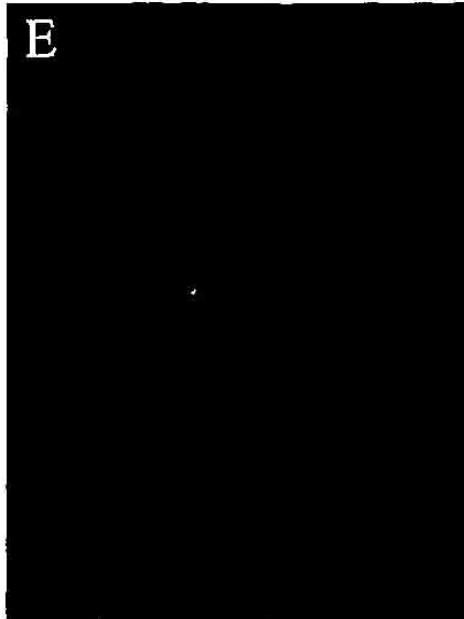
**FIGURA 13B.**



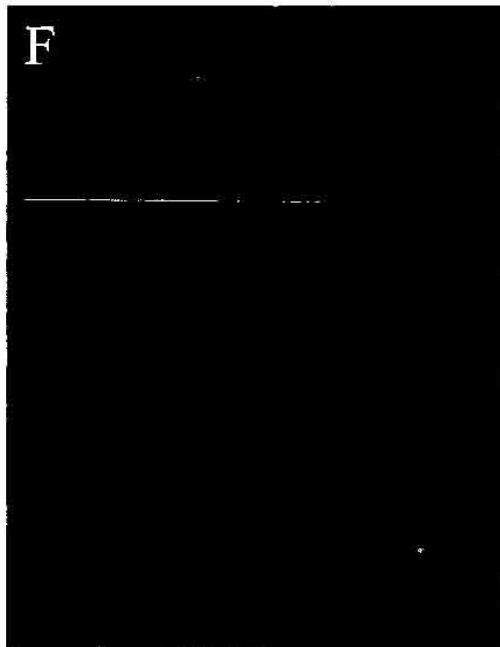
**FIGURA 13C.**



**FIGURA 13D.**



**FIGURA 13E.**



**FIGURA 13F.**