

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 182**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2011 PCT/US2011/023797**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11142858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2011 E 11780950 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2569330**

54 Título: **Variantes de clorotoxina, conjugados y métodos para su utilización**

30 Prioridad:

11.05.2010 US 333556 P

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

14.02.2017

73 Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (100.0%)
1100 Fairview Avenue North
Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

OLSON, JAMES, M.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 601 182 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

Variantes de clorotoxina, conjugados y métodos para su utilización

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud estadounidense n.º 61/333,556, presentada el 11 de mayo de 2010.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

10 La presente divulgación se refiere de manera general a clorotoxina, y más particularmente a variantes de clorotoxina, a conjugados de variantes de clorotoxina, a composiciones que incluyen las variantes o conjugados de clorotoxina, y a métodos para utilizar las variantes, conjugados y composiciones de clorotoxina.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

15 Los neurocirujanos han buscado desde hace mucho tiempo métodos para iluminar las células cancerosas cerebrales para identificar focos de cáncer y distinguir el cáncer del tejido normal en tiempo real durante operaciones de resección de tumores. Un bioconjugado compuesto por clorotoxina (CTX), un péptido descubierto a partir del escorpión *Leiurus quinquestriatus*, y moléculas fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIRF), tales como Cy5.5, ("pintura tumoral") identifica claramente focos de tumor con alta sensibilidad (M. Veiseh, *et al.*, "Tumor Paint: A Chlorotoxin: Cy5.5 Bioconjugate for Intra-Operative Visualization of Cancer Foci", *Cancer Research* 67(14):6882-88, 2007). CTX se seleccionó originalmente para estos estudios porque se une de manera preferencial a células de glioma en comparación con tejido cerebral normal (L. Soroceanu, *et al.*, "Use of Chlorotoxin for Targeting of Primary Brain Tumors", *Cancer Research* 58:4871-4879, 1998). Dado que la diana de CTX parece estar compartida por otros múltiples tipos de cáncer, CTX: Cy5.5 iluminó eficazmente tumores de próstata, colon, sarcoma, meduloblastoma y otros tipos de tumores sólidos (M. Veiseh 2007).

30 CTX es un péptido de 36 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro que confiere un alto grado de estructura tridimensional al polipéptido. CTX tiene tres residuos de lisina en las posiciones 15, 23 y 27 que se han utilizado para la conjugación a Cy5.5 modificado con éster de NHS y otras moléculas fluorescentes. El bioconjugado resultante es una mezcla de normalmente el 75-85% de péptido monomarcado en la posición 27 y cantidades menores de péptido di y trimarcado conjugado con Lys 15 y Lys 23. Aunque es posible que la Food and Drug Administration (FDA) y agencias normativas similares en otras partes aprueben mezclas, la comercialización se ve posiblemente impedida ya que en el futuro resulta caro y difícil que coincida la razón de lotes mono, di y trimarcados.

35 Existe la necesidad de un polipéptido que tenga las propiedades ventajosas de clorotoxina y que tenga un único residuo de lisina para su conjugación con agentes de diagnóstico o terapéuticos para proporcionar una única nueva entidad molecular homogénea. La presente divulgación busca cubrir esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas adicionales.

40 El documento WO2006/115633 describe un conjugado de cianina-clorotoxina y un método para la visualización fluorescente intraoperatoria de cáncer. Veiseh *et al.* (*Cancer Res.* (2007) 67(14): 6882-6888) describe un bioconjugado de clorotoxina: Cy5.5 para la visualización intraoperatoria de focos de cáncer. Veiseh *et al.* (*Nano Letters* (2005) 5(6): 1003-1008) describe una nanosonda multifuncional óptica y de IRM para seleccionar gliomas como diana. Veiseh *et al.* (*Cancer Res.* (2009) 69(15): 6200-6207) describe la selección como diana específica de tumores cerebrales con una nanosonda óptica/de IRM a través de la barrera hematoencefálica. El documento US2009/004105 describe la obtención de imágenes moleculares de la expresión de metaloproteinasas de la matriz utilizando clorotoxina marcada.

SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

50 La invención se define por las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

55 La presente divulgación proporciona variantes de clorotoxina, conjugados preparados a partir de las variantes de clorotoxina, composiciones que incluyen las variantes o conjugados de clorotoxina, y métodos para utilizar las variantes, conjugados y composiciones de clorotoxina.

60 En un aspecto, la divulgación proporciona un péptido de clorotoxina modificado que tiene un único residuo de lisina (Lys 27). En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene Lys 15 y Lys 23 de clorotoxina nativa sustituidos por un aminoácido distinto de lisina. En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6.

65

También se proporcionan composiciones que comprenden un péptido de clorotoxina modificado de la divulgación. En un caso, la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o un estado que puede tratarse mediante la administración de clorotoxina, que comprende administrar una cantidad eficaz de un péptido de clorotoxina modificado de la divulgación a un sujeto que lo necesita.

10 En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un conjugado de clorotoxina que comprende un péptido de clorotoxina modificado de la divulgación. En un caso, el conjugado de clorotoxina comprende un péptido de clorotoxina modificado acoplado covalentemente a uno o más de un agente terapéutico, de diagnóstico, de obtención de imágenes o de direccionamiento, o un resto que aumenta la semivida en circulación del péptido de clorotoxina modificado. En un caso, el agente terapéutico, de diagnóstico, de obtención de imágenes o de direccionamiento, o un resto que aumenta la semivida en circulación del péptido de clorotoxina modificado está acoplado covalentemente al péptido de clorotoxina modificado a través del residuo de lisina. Los agentes de diagnóstico o de obtención de imágenes adecuados incluyen marcadores fluorescentes (p. ej., punto cuántico o punto polimérico), radiomarcadores y marcadores de obtención de imágenes por resonancia magnética (p. ej., una nanopartícula de boro, una nanopartícula de boro y carbono, una nanopartícula de carburo de boro, polímero que contiene boro, un polímero que contiene boro y carbono, polímero que contiene carburo de boro, y cualquiera de estas nanopartículas o polímeros que comprenden además gadolinio). Los agentes de direccionamiento adecuados incluyen anticuerpos, polipéptidos, polisacáridos y ácidos nucleicos. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen agentes quimioterápicos (p. ej., metotrexato, docetaxel, cisplatino y etopósido) y agentes terapéuticos biológicos (p. ej., ADNc, ARNip, ARNhp e iARN). Los restos adecuados que aumentan la semivida en circulación del péptido de clorotoxina modificado incluyen restos de PEG, restos de glicosilo y restos de glicosil-PEG.

25 En otros aspectos, se proporcionan métodos para utilizar los conjugados de clorotoxina.

En un caso, la divulgación proporciona un método para obtener imágenes de un tejido del que pueden obtenerse imágenes mediante clorotoxina, que comprende poner en contacto un tejido del que pueden obtenerse imágenes mediante clorotoxina con un conjugado de clorotoxina de la divulgación para obtener imágenes de un tejido del que pueden obtenerse imágenes mediante clorotoxina.

30 En un caso, la divulgación proporciona un método para detectar cáncer que puede detectarse mediante clorotoxina, que comprende poner en contacto un tejido del que pueden obtenerse imágenes mediante clorotoxina modificada con un conjugado de clorotoxina modificada de la divulgación para detectar cáncer que puede detectarse mediante clorotoxina.

35 En un caso, la divulgación proporciona un método para detectar y eliminar cáncer que puede detectarse mediante clorotoxina, que comprende poner en contacto un tejido con un conjugado de clorotoxina modificada de la divulgación para detectar tejido canceroso y eliminar el tejido canceroso detectado mediante el conjugado de clorotoxina modificada.

40 En un caso, la divulgación proporciona un método para tratar cáncer seleccionado como diana por un conjugado de clorotoxina modificada, que comprende poner en contacto un tejido que se une a clorotoxina modificada con un conjugado de clorotoxina modificada de la divulgación para tratar el cáncer.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 Los aspectos anteriores y muchas de las ventajas relacionadas de esta divulgación se apreciarán más fácilmente al entenderse mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos.

50 La figura 1 compara las secuencias de clorotoxina nativa (CTX lineal) con péptidos de clorotoxina modificados representativos de la divulgación (K15A_K23A CTX; K15R_K23R CTX). Las secuencias de CTX nativa y sustituida con cuatro enlaces disulfuro mostrados como líneas amarillas.

55 La figura 2 es una comparación de los desplazamientos químicos de α H secundarios de péptidos de clorotoxina modificados representativos de la divulgación y clorotoxina nativa. Los desplazamientos de α H secundarios se calcularon restando los desplazamientos de enrollamientos al azar de los desplazamientos de α H experimentales (D.S. Wishart, *et al.*, ^1H , ^{13}C y ^{15}N Chemical Shift Referencing in Biomolecular NMR", *Journal of Biomolecular NMR* 6, 135-140, 1995). Un gráfico de barras de CTX nativa (azul oscuro), CTX lineal (azul), K15A_K23A CTX (rojo) y K15R_K23R CTX (naranja). Se muestran dos cadenas β como flecha azul, la hélice α se muestra en rojo. Los residuos sustituidos y el residuo D18 se muestran con un asterisco verde.

60 Las figuras 3A y 3B ilustran la obtención de imágenes funcional con bioconjugados de CTX modificada representativa: Cy5.5 de la divulgación (figura 3A, K15A_K23A CTX: Cy5.5; y figura 3B, K15R_K23R CTX: Cy5.5). A ratones que portaban tumor WT o ND2:SmoA1 se les inyectaron 50 μl de bioconjugado modificado 40 μM a través de la vena de la cola. Se tomaron imágenes biofotónicas tres días tras la inyección utilizando el sistema Xenogen Spectrum. Se congelaron los cerebros en OCT, se cortaron en secciones de 12 μm y se tiñeron con H&E para determinar la carga tumoral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

- 5 La presente divulgación proporciona variantes de clorotoxina, conjugados preparados a partir de las variantes de clorotoxina, composiciones que incluyen las variantes o conjugados de clorotoxina, y métodos para utilizar las variantes, conjugados y composiciones de clorotoxina.
- 10 En un aspecto, la divulgación proporciona variantes de clorotoxina. Tal como se utiliza en la presente, el término "variante de clorotoxina " se utiliza de manera intercambiable con el término "péptido de clorotoxina modificado" y se refiere a un polipéptido no nativo que presenta al menos algunas de las actividades útiles de clorotoxina nativa. La clorotoxina es un polipéptido que se produce de manera natural que comprende 36 aminoácidos y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1.
- 15 El término "péptido de clorotoxina modificado" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que uno o más de los residuos de aminoácido de clorotoxina nativa están sustituidos (es decir, reemplazados) por un residuo de aminoácido distinto del de la clorotoxina nativa en esa posición. Por ejemplo, los residuos 15 y 23 de clorotoxina nativa son residuos de lisina; en determinados casos de la divulgación, se proporcionan péptidos de clorotoxina modificados que tienen residuos de alanina o arginina en las posiciones 15 y 23.
- 20 En un caso, la divulgación proporciona un péptido de clorotoxina modificado que tiene un único residuo de lisina (Lys 27). En este caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene Lys 15 y Lys 23 de clorotoxina nativa sustituidos por un aminoácido distinto de lisina para proporcionar una clorotoxina modificada que tiene un único residuo de lisina (Lys 27). En este caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, en la que Lys 15 y Lys 23 están sustituidos por un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en aminoácidos que se producen de manera natural y no naturales, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos.
- 25 Los aminoácidos que se producen de manera natural son los veinte L-aminoácidos comúnmente encontrados en proteínas que se producen de manera natural (Ala o A, Cys o C, Asp o D, Glu o E, Phe o F, Gly o G, His o H, Ile o I, Lys o K, Leu o L, Met o M, Asn o N, Pro o P, Gln o Q, Arg o R, Ser o S, Thr o T, Val o V, Trp o W, Tyr o Y). Los aminoácidos no naturales incluyen los D-aminoácidos. Los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, únicamente a modo de ejemplo, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener estructuras principales peptídicas modificadas, al tiempo que todavía conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural. Los ejemplos no limitativos de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina.
- 30 En un caso, Lys 15 y/o Lys 23 se reemplazan independientemente por un aminoácido básico (es decir, His, Arg), aminoácido no natural, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido.
- 35 En un caso, Lys 15 y/o Lys 23 se reemplazan independientemente por un aminoácido no polar (hidrófobo) (es decir, Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Val, Trp), aminoácido no natural relacionado, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido.
- 40 En un caso, Lys 15 y/o Lys 23 se reemplazan independientemente por un aminoácido polar (no cargado) (es decir, Cys, Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr), aminoácido no natural, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido.
- 45 En un caso, Lys 15 y/o Lys 23 se reemplazan independientemente por un aminoácido ácido (es decir, Glu, Asp), aminoácido no natural, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido.
- 50 En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene Lys 15 y Lys 23 sustituidos por alanina (K15A_K23A CTX). En este caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.
- 55 En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene Lys 15 y Lys 23 sustituidos por arginina (K15R_K23R CTX). En este caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4.
- 60 En un caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene Lys 15 sustituido por alanina y Lys 23 sustituido por arginina (K15A_K23R CTX). En este caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.
- 65 En otro caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene Lys 15 sustituido por arginina y Lys 23 sustituido por alanina (K15R_K23A CTX). En este caso, el péptido de clorotoxina modificado tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6.
- En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan composiciones que incluyen los péptidos de clorotoxina modificados. La composición puede incluir un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para la administración del péptido de

clorotoxina modificado. Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen solución salina o dextrosa para inyección.

5 Métodos de tratamiento. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o un estado que puede tratarse mediante la administración de clorotoxina. En un caso, el método incluye administrar una cantidad eficaz de un péptido de clorotoxina modificado de la divulgación a un sujeto que lo necesita.

10 El término "cantidad eficaz", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se administra que aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas de la enfermedad o el estado que está tratándose. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Pueden administrarse composiciones que contienen tales agentes o compuestos para tratamientos profilácticos, de potenciación y/o terapéuticos. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse utilizando técnicas, tales como un estudio de aumento a escala de la dosis.

15 En un caso, la divulgación proporciona un método para tratar un cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una variante de clorotoxina de la divulgación.

20 En un caso, la divulgación proporciona un método para tratar un cáncer que expresa sitios de unión a clorotoxina, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una variante de clorotoxina de la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 En un caso, la divulgación proporciona un método para tratar un tumor que expresa sitios de unión a clorotoxina, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una variante de clorotoxina de la divulgación.

30 En un caso, la divulgación proporciona un método para inhibir la actividad invasiva de células que expresan sitios de unión a clorotoxina, que comprende administrar una cantidad eficaz de una variante de clorotoxina a células que expresan sitios de unión a clorotoxina.

Los métodos de tratamiento de la divulgación son aplicables a sujetos humanos y animales que necesitan tal tratamiento.

35 Prácticamente cualquier tipo de cáncer maligno que expresa sitios de unión a clorotoxina puede tratarse mediante las variantes y los conjugados de clorotoxina de la divulgación. Estos cánceres malignos incluyen gliomas, astrocitomas, meduloblastomas, carcinomas de plexos coroideos, ependimomas, meningioma, glioblastoma, ganglioma, feocromocitoma y tumores cerebrales metastásicos, otros tumores cerebrales, neuroblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer intestinal, cáncer pancreático, cáncer de colon, 40 cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de piel, sarcomas (más de 30 tipos), osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, carcinomas, melanomas, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, 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 testicular y tumor de Wilm.

45 Conjugados de clorotoxina. En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados de los péptidos de clorotoxina modificados de la divulgación. En un caso, los conjugados comprenden un péptido de clorotoxina modificado de la divulgación acoplado covalentemente a un resto que aumenta la semivida en circulación del péptido de clorotoxina modificado. En otro caso, los conjugados comprenden un péptido de clorotoxina modificado de la divulgación acoplado covalentemente a un agente terapéutico, de diagnóstico, de obtención de imágenes o de direccionamiento. En 50 determinados casos, el agente terapéutico, de diagnóstico, de obtención de imágenes o de direccionamiento, o resto que aumenta la semivida en circulación del péptido de clorotoxina modificado se acopla covalentemente a través del residuo de lisina del péptido.

55 Los restos adecuados que aumentan la semivida en circulación del péptido de clorotoxina modificado incluyen los conocidos en la técnica para aumentar la semivida en circulación de polipéptidos (p. ej., pegilación, glicosilación, glicopegilación). Los restos representativos para pegilación incluyen poli(óxidos de alquileno) (poli(óxidos de etileno), poli(óxidos de propileno), y copolímeros de poli(óxidos de etileno) y poli(óxidos de propileno)). Los restos representativos para la glicosilación incluyen oligosacáridos (p. ej., carbohidratos incluyendo ácidos polisialícos). En un caso, el conjugado es una clorotoxina pegilada y comprende un péptido de clorotoxina modificado acoplado covalentemente a uno o más poli(óxidos de alquileno) (p. ej., poli(óxido de etileno)). En un caso, el conjugado es una 60 clorotoxina glicosilada y comprende un péptido de clorotoxina modificado acoplado covalentemente a uno o más oligosacáridos. En un caso, el conjugado es una clorotoxina glicopegilada y comprende un péptido de clorotoxina modificado acoplado covalentemente a uno o más glico-poli(óxidos de alquileno)(p. ej., glico-poli(óxido de etileno)).

65 Los agentes terapéuticos adecuados incluyen agentes citotóxicos. Los agentes terapéuticos representativos incluyen agentes quimioterápicos tales como metotrexato, docetaxel, cisplatino y etopósido, entre otros; agentes terapéuticos

biológicos tales como moléculas de ácido nucleico (p. ej., ADN tal como ADNc, y ARN tal como ARNip, ARNhp, iARN) incluyendo inhibidores de transcripción y translocación, y los moduladores de transducción de señal.

5 Los agentes de diagnóstico adecuados incluyen agentes que proporcionan la detección mediante métodos de fluorescencia así como métodos distintos de la obtención de imágenes por fluorescencia. Otros agentes de diagnóstico adecuados incluyen radiomarcadores (p. ej., compuestos marcados con radioisótopos) tales como ¹²⁵I, ¹⁴C y ³¹P, entre otros; y agentes de obtención de imágenes por resonancia magnética.

10 Los agentes de direccionamiento adecuados incluyen anticuerpos, polipéptidos, polisacáridos y ácidos nucleicos.

15 En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan composiciones que incluyen los conjugados de péptido de clorotoxina modificado. La composición puede incluir un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para la administración del conjugado de péptido de clorotoxina modificado. Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen solución salina o dextrosa para inyección.

20 Métodos de obtención de imágenes. En un aspecto adicional de la divulgación, se proporcionan métodos de utilizar los conjugados de péptido de clorotoxina modificado. En un caso, la divulgación proporciona un método para obtener imágenes de un tejido del que pueden obtenerse imágenes mediante clorotoxina. En el método, se pone en contacto un tejido del que pueden obtenerse imágenes mediante clorotoxina con un conjugado de clorotoxina.

25 En un caso, el método de obtención de imágenes es un método de de obtención de imágenes por fluorescencia. Se describen métodos representativos para preparar y utilizar conjugados de clorotoxina fluorescentes en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20080279780 A1, Fluorescent Chlorotoxin Conjugate and Method for Intra-Operative Visualization of Cancer.

30 La presente divulgación proporciona un conjugado de clorotoxina que puede detectarse mediante obtención de imágenes por fluorescencia que permite la visualización intraoperatoria de tejidos cancerosos, composiciones que incluyen el conjugado de clorotoxina y métodos para utilizar el conjugado de clorotoxina.

35 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de clorotoxina que puede detectarse mediante obtención de imágenes por fluorescencia que permite la visualización intraoperatoria de tejidos cancerosos.

La clorotoxina es un agente de direccionamiento que dirige el conjugado a un tejido de interés. En un caso, el conjugado de clorotoxina de la divulgación incluye uno o más restos fluorescentes (p. ej., restos fluorescentes de emisión en rojo o en el infrarrojo cercano) acoplados covalentemente a la clorotoxina.

40 Tal como se utiliza en la presente, el término "resto fluorescente que emite en rojo o en el infrarrojo cercano" se refiere a un resto fluorescente que tiene un máximo de emisión de fluorescencia superior a aproximadamente 600 nm. Los conjugados de clorotoxina fluorescentes que tienen restos fluorescentes que emiten a una longitud de onda más corta (p. ej., de desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 600 nm) son útiles en la obtención de imágenes histoquímica. Estos conjugados pueden ser menos útiles para la obtención de imágenes *in vivo* en seres humanos y animales en la que se prefieren restos fluorescentes que emiten a una longitud de onda más larga (p. ej., superior a aproximadamente 600 nm).

45 En determinados casos del conjugado de clorotoxina, los restos fluorescentes se derivan de compuestos fluorescentes caracterizados por máximos de longitud de onda de emisión superiores a aproximadamente 600 nm para evitar autofluorescencia, emisión que se desplaza a través de milímetros a un centímetro de tejido/sangre/líquidos, emisión que no se absorbe por hemoglobina, otros componentes sanguíneos, o proteínas en tejido humano o animal.

50 El resto fluorescente está acoplado covalentemente a la clorotoxina para permitir la visualización del conjugado mediante obtención de imágenes por fluorescencia. El resto fluorescente se deriva de un compuesto fluorescente. Compuestos fluorescentes adecuados son aquellos que pueden acoplarse covalentemente a una clorotoxina sin afectar de manera sustancialmente adversa a la función de direccionamiento y unión del conjugado de clorotoxina. De manera similar, los compuestos fluorescentes adecuados conservan sus propiedades fluorescentes tras la conjugación con la clorotoxina.

55 En un caso, el resto fluorescente es un resto de cianina. Los compuestos de cianina se caracterizan por sus coeficientes de extinción relativamente altos y rendimientos cuánticos de fluorescencia favorables. El máximo de longitud de onda de emisión de fluorescencia para un compuesto de cianina varía como función de la estructura de cianina. Dependiendo del compuesto de cianina particular, los máximos de longitud de onda de emisión de fluorescencia pueden variar desde el verde (aproximadamente 490 nm) hasta el infrarrojo cercano (aproximadamente 740 nm). En la práctica de los métodos de la divulgación, se prefieren compuestos de cianina que tienen máximos de emisión de fluorescencia del rojo lejano (aproximadamente 650 nm) al infrarrojo cercano (aproximadamente 750 nm). A estas longitudes de onda de emisión, la fluorescencia de fondo del entorno local es mínima y los tejidos de interés son relativamente transparentes. Debido a la transparencia relativa de los tejidos de interés a estas longitudes de onda, la visualización por excitación y emisión de fluorescencia se maximiza y pueden observarse cantidades relativamente mayores de tejido seleccionado como diana

por el conjugado de la divulgación en comparación con otros conjugados que utilizan compuestos fluorescentes que tienen emisión a longitudes de onda más cortas (menos de 600 nm).

5 Las cianinas adecuadas incluyen los fluoros CYDYE comercialmente disponibles de GE Healthcare con la denominación 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) (máximos de emisión entre paréntesis). En un caso, el compuesto de cianina es Cy5.5.

10 En un caso, el resto fluorescente es un resto de xanteno sulfonado. Se describen compuestos de xanteno sulfonados adecuados para su utilización en la práctica de la divulgación en la patente estadounidense n.º 6,130,101 y están comercialmente disponibles con la denominación ALEXA FLUOR de Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. ALEXA FLUOR es la denominación para una familia de fluoróforos que se caracterizan por sus coeficientes de extinción relativamente altos y rendimientos cuánticos de fluorescencia favorables. El máximo de longitud de onda de emisión de fluorescencia para un compuesto de xanteno sulfonado varía como función de la estructura del compuesto. Dependiendo del compuesto de xanteno sulfonado particular, los máximos de longitud de onda de emisión de fluorescencia pueden variar desde el verde (aproximadamente 450 nm) hasta el infrarrojo cercano (aproximadamente 780 nm). En la práctica de los métodos de la divulgación, se prefieren compuestos de ALEXA FLUOR que tienen máximos de emisión de fluorescencia del rojo lejano (aproximadamente 650 nm) al infrarrojo cercano (aproximadamente 750 nm).

20 Los compuestos de xanteno sulfonado adecuados incluyen ALEXA FLUORS, 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) (máximos de emisión entre paréntesis). En un caso, el xanteno sulfonado es ALEXA FLUOR 680. Pueden prepararse conjugados de xanteno sulfonado-clorotoxina de una manera análoga a la descrita en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Richard P. Haugland (Molecular Probes, Inc., una filial de Invitrogen Corp.).

30 Otros fluoróforos de NIR adecuados útiles en la divulgación incluyen DyLight-680, DyLight-750, VivoTag-750, DyLight-800, IRDye-800, VivoTag-680, y verde de indocianina.

35 Los péptidos de clorotoxina modificados de la divulgación también pueden acoplarse a puntos cuánticos y puntos poliméricos.

40 Los compuestos fluorescentes adecuados incluyen un grupo funcional que hace que el compuesto sea químicamente reactivo frente a la clorotoxina. Los grupos funcionales adecuados incluyen el grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) para el acoplamiento covalente a grupos amina, el grupo maleimida para el acoplamiento covalente a grupos tiol, y el grupo hidrazida para el acoplamiento covalente a grupos aldehído. Preferiblemente, el compuesto fluorescente útil en la preparación del conjugado de la divulgación incluye un único grupo funcional reactivo (p. ej., mono-éster de NHS). Se apreciará que otras químicas de conjugación son adecuadas para preparar el conjugado de clorotoxina de la presente divulgación.

45 Los conjugados adecuados de la divulgación incluyen desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 restos fluorescentes/clorotoxina. En un caso, el conjugado incluye aproximadamente 1 resto fluorescente.

50 En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan composiciones que incluyen el conjugado de clorotoxina. La composición es adecuada para su administración a un ser humano y sujetos animales e incluye un portador farmacéuticamente aceptable. La composición incluye una cantidad farmacológicamente eficaz de un conjugado de clorotoxina modificada. Una cantidad eficaz puede determinarse de manera rutinaria mediante procedimientos establecidos. Una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para ocupar sitios de unión a clorotoxina en células cancerosas, pero lo bastante baja como para minimizar la unión no específica a tejidos no neoplásicos. Una cantidad eficaz optimiza la relación señal-ruido para la obtención de imágenes intraoperatoria.

55 La divulgación proporciona métodos para detectar un tejido utilizando los conjugados de clorotoxina. Los conjugados de clorotoxina de la divulgación seleccionan como diana, y se unen a, sitios de unión a clorotoxina. Se apreciará que los sitios de unión a clorotoxina pueden adoptar dos formas: sitios que se unen a clorotoxina y sitios que se unen a los conjugados de clorotoxina de la divulgación. Se apreciará que los sitios de unión a clorotoxina pueden ser distintos de los sitios de unión a conjugado de clorotoxina.

60 En un caso, se proporciona un método para diferenciar focos de cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina de tejido no neoplásico. El método incluye las etapas de:

65 (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina que tiene afinidad y especificidad por células que expresan sitios de unión a clorotoxina, en el que el conjugado de clorotoxina comprende

uno o más restos fluorescentes que emiten en rojo o en el infrarrojo cercano acoplados covalentemente a una clorotoxina; y

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

En un caso, se proporciona un método para detectar cánceres que expresan sitios de unión a clorotoxina. El método incluye las etapas de:

10 (a) poner en contacto un tejido de interés con un conjugado de clorotoxina que tiene afinidad y especificidad por células que expresan sitios de unión a clorotoxina, en el que el conjugado de clorotoxina comprende uno o más restos fluorescentes que emiten en rojo o en el infrarrojo cercano acoplados covalentemente a una clorotoxina; y

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

En un caso, se proporciona un método para determinar la ubicación de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina en un paciente de manera intraoperatoria. El método incluye las etapas de:

20 (a) administrar una composición farmacéutica a un paciente, en el que la composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de un conjugado de clorotoxina suficiente para obtener imágenes de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina *in vivo*, en el que el conjugado de clorotoxina comprende uno o más restos fluorescentes que emiten en rojo o en el infrarrojo cercano acoplados covalentemente a una clorotoxina;

30 (b) medir el nivel de unión del conjugado de clorotoxina mediante obtención de imágenes por fluorescencia para determinar la ubicación de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina, en el que un nivel de unión elevado, con respecto a tejido normal, es indicativo de la presencia de células cancerosas que expresan sitios de unión a clorotoxina; y

(c) eliminar quirúrgicamente del paciente al menos algunas células que expresan sitios de unión a clorotoxina localizadas mediante obtención de imágenes por fluorescencia.

35 Los métodos de obtención de imágenes de la divulgación para la detección de focos de cáncer son aplicables a modelos de ratón y de otros animales de cáncer así como a la práctica veterinaria.

El conjugado de clorotoxina fluorescente de la divulgación puede incluir otros agentes útiles. Otros agentes útiles incluyen agentes de diagnóstico y agentes terapéuticos.

40 En otro caso, el método de obtención de imágenes es un método de obtención de imágenes por resonancia magnética. Se describen métodos representativos para preparar y utilizar conjugados de clorotoxina en obtención de imágenes por resonancia magnética en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 200701254965 A1, Chlorotoxin-Labeled Nanoparticle Compositions and Methods for Targeting Primary Brain Tumors.

45 La presente divulgación proporciona nanopartículas marcadas con clorotoxina que pueden seleccionar tumores cerebrales primarios como diana, composiciones que incluyen las nanopartículas, métodos de obtención de imágenes de tejidos utilizando las nanopartículas y métodos para tratar células que expresan sitios de unión a clorotoxina utilizando las nanopartículas.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona una partícula marcada con clorotoxina que comprende:

(a) un núcleo que tiene una superficie, comprendiendo el núcleo un material que tiene actividad de obtención de imágenes por resonancia magnética;

55 (b) un péptido de clorotoxina modificado; y

(c) un grupo de unión que acopla covalentemente el péptido de clorotoxina modificado a la superficie.

60 El núcleo incluye un material que tiene actividad de obtención de imágenes por resonancia magnética. Los materiales adecuados que tienen actividad de obtención de imágenes por resonancia magnética incluyen óxidos de metal, tales como óxido ferroso, óxido férrico, óxido de silicio, óxido de silicio policristalino, óxido de aluminio, óxido de germanio, seleniuro de zinc, dióxido de estaño, dióxido de titanio, óxido de indio y estaño, y óxido de gadolinio. Pueden utilizarse mezclas de uno o más óxidos de metales.

65

Además de materiales magnéticos, el núcleo puede incluir materiales no magnéticos, tales como nitruro de silicio, acero inoxidable, titanio, boro, carburo de boro, mezclas de boro y carbono, y níquel-titanio. También pueden utilizarse mezclas de uno o más materiales no magnéticos.

5 Las partículas de la divulgación incluyen desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 clorotoxinas modificadas/partícula. En un caso, las partículas incluyen desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 clorotoxinas modificadas/partícula. En un caso, las partículas incluyen aproximadamente 10 clorotoxinas modificadas/partícula. En un caso, las partículas incluyen de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 100 clorotoxinas modificadas/partícula.

10 Tal como se indicó anteriormente, la nanopartícula magnética de la divulgación incluye una clorotoxina que sirve como resto de direccionamiento que es eficaz para dirigir la nanopartícula a células que expresan sitios de unión a clorotoxina en los que se une la nanopartícula. Las células de tumor cerebral primario (p. ej., células de tumor neuroectodérmico y células de glioma) incluyen sitios de unión a clorotoxina.

15 Las nanopartículas marcadas con clorotoxina pueden incluir además otros agentes útiles. Otros agentes útiles incluyen agentes de diagnóstico.

20 Los agentes de diagnóstico adecuados incluyen agentes que proporcionan la detección de la nanopartícula mediante métodos distintos de la obtención de imágenes por resonancia magnética. Los agentes de diagnóstico adecuados incluyen compuestos emisores de luz (p. ej., fluoróforos, fósforos y luminóforos). Los fluoróforos adecuados incluyen los indicados anteriormente.

25 En un caso, la partícula marcada con clorotoxina comprende además un resto fluorescente. Las partículas de la divulgación incluyen desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 restos fluorescentes/partícula. En un caso, las partículas incluyen desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 restos fluorescentes/partícula.

30 En un caso, el resto fluorescente se selecciona de restos fluorescentes que emiten en rojo y en el infrarrojo cercano (es decir, restos fluorescentes que tienen máximos de emisión superiores a aproximadamente 600 nm). En un caso, el resto fluorescente es un resto de cianina. En un caso, el resto fluorescente es un resto de Cy5.5.

Otros agentes de diagnóstico adecuados incluyen radiomarcadores (p. ej., compuestos marcados con radioisótopos) tales como ^{125}I , ^{14}C y ^{31}P , entre otros.

35 En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan composiciones que incluyen las partículas de la divulgación. En un caso, la composición incluye una nanopartícula adecuada para su administración a un ser humano o un sujeto animal. La composición puede incluir un portador aceptable. En un caso, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable e incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente el término "portador" se refiere a un diluyente (p. ej., solución salina) para facilitar la administración de las partículas.

40 En otros aspectos, la divulgación proporciona métodos para utilizar nanopartículas.

45 En un caso, la divulgación proporciona un método para diferenciar células de tumor neuroectodérmico de tejido cerebral no neoplásico. En el método, las células de tumor neuroectodérmico se diferencian de tejido cerebral no neoplásico mediante:

(a) poner en contacto un tejido de interés con una nanopartícula marcada con clorotoxina que tiene afinidad y especificidad por células de tumor neuroectodérmico; y

50 (b) medir el nivel de unión de la nanopartícula marcada con clorotoxina, en el que un nivel de unión elevado, con respecto a tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.

En un caso, la divulgación proporciona un método para detectar células de tumor neuroectodérmico. En el método, se detectan células de tumor neuroectodérmico mediante:

55 (a) poner en contacto un tejido de interés con una nanopartícula marcada con clorotoxina que tiene afinidad y especificidad por células de tumor neuroectodérmico; y

60 (b) medir el nivel de unión de la nanopartícula marcada con clorotoxina, en el que un nivel de unión elevado, con respecto a tejido normal, es indicativo de que el tejido es neoplásico.

Los métodos anteriores son útiles en la diferenciación y detección de células de glioma.

65 En los métodos anteriores, medir el nivel de unión de la nanopartícula marcada con clorotoxina comprende obtener imágenes por resonancia magnética.

En determinados casos de los métodos anteriores, la nanopartícula marcada con clorotoxina comprende además un resto fluorescente. En estos casos, medir el nivel de unión de la nanopartícula marcada con clorotoxina puede incluir obtener imágenes por fluorescencia.

5 En un caso, la divulgación proporciona un método para determinar la ubicación de células de glioma en un paciente de manera preoperatoria, intraoperatoria y posoperatoria. El método incluye las etapas de:

10 (a) administrar una composición farmacéutica a un paciente, en el que la composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de una nanopartícula marcada con fluoróforo/clorotoxina suficiente para obtener imágenes de células de glioma *in vivo*;

15 (b) medir el nivel de unión de la nanopartícula marcada con fluoróforo/clorotoxina mediante obtención de imágenes por resonancia magnética de manera preoperatoria para determinar la ubicación de células de glioma, en el que un nivel de unión elevado, con respecto a tejido normal, es indicativo de la presencia de células de glioma;

(c) eliminar quirúrgicamente del paciente al menos algunas células de glioma localizadas mediante obtención de imágenes por resonancia magnética;

20 (d) medir el nivel de unión de la nanopartícula marcada con fluoróforo/clorotoxina mediante obtención de imágenes por fluorescencia de manera intraoperatoria para determinar la ubicación de células de glioma residuales, en el que un nivel de unión elevado, con respecto a tejido normal, es indicativo de la presencia de células de glioma residuales;

25 (e) eliminar quirúrgicamente del paciente al menos algunas células de glioma residuales localizadas mediante obtención de imágenes por fluorescencia; y

30 (f) medir el nivel de unión de la nanopartícula marcada con fluoróforo/clorotoxina mediante obtención de imágenes por resonancia magnética de manera posoperatoria para determinar la ubicación de células de glioma, en el que un nivel de unión elevado, con respecto a tejido normal, es indicativo de la presencia de células de glioma.

En el método, una cantidad de una nanopartícula marcada con fluoróforo/clorotoxina suficiente para obtener imágenes de células de glioma *in vivo* es una cantidad de desde aproximadamente 1-20 mg de Fe/kg de peso corporal ("Fe" se refiere a hierro presente en el núcleo de la partícula).

35 En el método anterior, las etapas (d) y (e) pueden repetirse.

El método anterior incluye obtención de imágenes de manera preoperatoria, intraoperatoria, y posoperatoria. Se apreciará que las variaciones del método anterior están dentro del alcance de la divulgación. Otras variaciones del método incluyen, por ejemplo, (1) obtener imágenes únicamente de manera preoperatoria; (2) obtener imágenes únicamente de manera intraoperatoria; (3) obtener imágenes únicamente de manera posoperatoria; (4) obtener imágenes únicamente de manera preoperatoria e intraoperatoria; (5) obtener imágenes únicamente de manera preoperatoria y posoperatoria; y (6) obtener imágenes únicamente de manera intraoperatoria y posoperatoria.

45 La divulgación proporciona métodos para tratar un tejido utilizando las nanopartículas.

En un caso, la divulgación proporciona un método para tratar un glioma en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula marcada con clorotoxina y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 En un caso, la divulgación proporciona un método para tratar un tumor neuroectodérmico, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula marcada con clorotoxina y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 En un caso, la divulgación proporciona un método para inhibir la actividad invasiva de células neoplásicas, que comprende administrar a células neoplásicas una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula marcada con clorotoxina y un portador farmacéuticamente aceptable.

60 A continuación se describen tres péptidos de clorotoxina modificados representativos de la divulgación y sus propiedades, conjugados de los péptidos y sus propiedades, y utilización de los conjugados en la obtención de imágenes.

65 Preparación de péptidos de clorotoxina modificados. En la figura 1 se muestran secuencias de dos péptidos de clorotoxina modificados (CTX) representativos de la divulgación (clorotoxina sustituida con alanina, K15A_K23A-CTX; clorotoxina sustituida con arginina, K15R_K23R-CTX). Se sintetizaron los péptidos utilizando química de neutralización *in situ* con Boc (*tert*-butoxicarbonil)/HBTU [hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio]. Se utilizó una solución de tampón de Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.2 M, glutatión reducido 5 mM / glutatión oxidado 0.5 mM con

un pH de 7.8 tanto para oxidar los péptidos sustituidos como para ciclizar y oxidar CTX a temperatura ambiente durante la noche. Se utilizó RP-HPLC para purificar los péptidos, y se confirmaron la pureza y las masas moleculares de los dos análogos de CTX, K15A_K23A-CTX y K15R_K23R-CTX, mediante RP-HPLC analítica y ES-EM.

5 Asignación de RMN. Se disolvieron los péptidos en el 90% de H₂O y el 10% de D₂O, y se registraron espectros unidimensionales y bidimensionales de TOCSY y NOESY a 600 MHz a 298 °K. Se asignaron los espectros de RMN utilizando técnicas bien establecidas (K. Wuthrich, "NMR of Proteins and Nucleic Acids", Wiley-Interscience, Nueva York, 1986). Los desplazamientos químicos en la región de la amida están bien dispersados, lo que confirma que los péptidos están correctamente plegados, y la región de huella en el espectro de NOESY de cada péptido muestra un ciclo completo de conectividades secuenciales αH–NH con la excepción de los dos residuos de prolina (Pro4 y Pro31). Sin embargo, tal como se esperaba, se observaron NOE a partir de los protones δ de los residuos de prolina y sus residuos anteriores. En la figura 2 se muestra una comparación de desplazamientos químicos de αH secundarios de CTX nativa y los análogos sintetizados.

15 Caracterización de bioconjugados de CTX sustituida. Se conjugaron los péptidos nativos y modificados con Cy5.5 y se purificaron tal como se describe a continuación en los ejemplos. Se analizaron los bioconjugados resultantes mediante HPLC y espectrometría de masas. Tal como se predice, las sustituciones de Ala y Arg sólo dieron como resultado bioconjugados de CTX monomarcada: Cy5.5.

20 Evaluación funcional de CTX sustituida: Cy5.5. Los posibles beneficios de la sustitución dependen de si la actividad de direccionamiento funcional de los péptidos es comparable con los bioconjugados de CTX nativa. Se sometió a ensayo la capacidad de cada péptido para dirigir la señal de Cy5.5 de manera preferible a células de meduloblastoma, con respecto a cerebro normal, mediante obtención de imágenes biofotónicas. En cada caso, se inyectaron 50 µL de bioconjugado 40 µM en la vena de la cola de ratones que mostraron signos clínicos congruentes con tumores cerebrales avanzados. Tras tres días se sacrificaron los ratones y se obtuvieron imágenes de sus cerebros utilizando el sistema de obtención de imágenes biofotónico Caliper/Xenogen Spectrum. Todos los conjugados de péptidos modificados iluminaron de manera preferible tejido de cáncer de meduloblastoma en comparación con cerebro normal (figuras 3A y 3B). En todos los casos, se comparó la señal en el tumor con la señal en el cerebelo de animales de control que recibieron inyección que no tenían meduloblastoma. La señal en el tumor en comparación con la normal fue de 1.96 +/- 0.47 para CTX nativa: Cy5.5 (n = 10); 3.3 +/- 1.8 para la sustitución con Ala (n = 8) y 2.6 +/- 0.85 para la sustitución con Arg (n = 5). Estadísticamente, ninguno de los bioconjugados de péptidos modificados podía distinguirse de CTX nativa: Cy5.5 lo que indica que las sustituciones de lisina no interferían con la unión de CTX a su diana.

35 Ventajas de la divulgación. Cuando se hace avanzar un nuevo producto terapéutico hacia ensayos clínicos con seres humanos, se tiene en cuenta no sólo la eficacia, farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad, sino también cuestiones prácticas que pueden poner en peligro la aprobación normativa o aumentar los costes de fabricación. La pintura tumoral, un bioconjugado que iluminó de manera segura y eficaz tumores sólidos en modelos de ratón, planteó un desafío de fabricación relacionado con el hecho de que el bioconjugado era en realidad una mezcla de CTX mono, di y trimarcada. La presente divulgación proporciona tres nuevas entidades químicas representativas que son funcionalmente equivalentes a CTX para dirigir moléculas de NIRF a cáncer pero se conjugan sólo con una única molécula de NIRF.

40 Se mapearon los sitios de conjugación de CTX en CTX: Cy5.5 utilizando escisión de arginasa acoplada con análisis proteómicos y mostraron que normalmente >80% del producto estaba monomarcado en Lys 27 y cantidades menores también estaban conjugadas en Lys 15 o Lys 23. En un análisis de CTX conjugada a otros cuatro tintes de NIRF, se observaron patrones similares de péptido predominantemente monomarcado con cantidades menores de péptido di y trimarcado, con la excepción de Dylight 750, un tinte de NIRF que sólo crea la especie monomarcada. El hecho de que Dylight 750 se une de manera monomérica a CTX sin modificar sugiere que el acceso a las otras dos lisinas está limitado.

45 Ninguno de los residuos de lisina en CTX parece estar implicado en la unión activa de CTX a su diana en células cancerosas. Esta conclusión se basa en las observaciones de que la unión a la diana se conserva a pesar de la sustitución de Lys 15 o Lys 23 por Ala o Arg y de que la adición de Cy5.5 voluminoso u otros tintes de NIRF a Lys 27 no impide la unión al sitio activo.

55 Procedimientos experimentales

Síntesis peptídica en fase sólida. Se utilizó síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) manual para sintetizar los péptidos con grupos de protección convencionales (p. ej. Asn(Xan), Asp(OcHex), Arg(TOS), Cys(MeBzl), Lys(ClZ), Ser(Bzl), Thr(Bzl) y Tyr(BrZ)). Se ensamblaron las CTX lineales sustituidas con Ala y Arg sobre resina de PAM-Arg sin un grupo de unión tioéster. Se logró la escisión de los péptidos de la resina utilizando fluoruro de hidrógeno (HF) con *p*-cresol y *p*-tiocresol como eliminadores (9:0.8:0.2 (vol/vol) de HF:*p*-cresol:*p*-tiocresol) a de -5 a 0 °C durante 1.5 h. Se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) con una columna C₁₈ para purificar los péptidos utilizando un gradiente del 0-80% de solución B (solución A: H₂O/ácido trifluoroacético al 0.05%; solución B: el 90% de CH₃CN/el 10% de H₂O/ácido trifluoroacético al 0.045%) monitorizando la absorbancia a 215 nm. La espectroscopía de masas por electropulverización (ES-EM) confirmó la pureza y la masa molecular de los péptidos sintetizados.

Plegamiento. Se oxidaron los análogos sustituidos con Ala y Arg en una solución de tampón acuoso que consistía en Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.2 M, glutatión reducido 5 mM / glutatión oxidado 0.5 mM con un pH de 7.8 a temperatura ambiente durante la noche. Se utilizó RP-HPLC para purificar los péptidos y se confirmaron la pureza y los pesos moleculares mediante RP-HPLC analítica y ES-EM.

5 Espectroscopía de RMN. Se utilizó espectroscopía de ¹H-RMN a 600 MHz para monitorizar las estructuras tridimensionales de los análogos peptídicos. Se disolvieron las muestras de péptido en el 90% de H₂O y el 10% de D₂O (v/v). Se obtuvo D₂O (al 99.99%) de Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, MA. Los experimentos de RMN bidimensional incluyeron espectros de espectroscopía de correlación total (TOCSY) y espectroscopía de efecto nuclear Overhauser (NOESY) que se registraron a 298 °K.

10 Ensayo de estabilidad en suero. Se llevó a cabo un ensayo de estabilidad en suero en suero humano masculino al 100% (Sigma) utilizando una concentración de péptido final de 20 μM. Se centrifugó el suero a 14000 g durante 10 min para eliminar el componente lipídico y se incubó el sobrenadante a 37 °C durante 15 min antes del ensayo. Se incubó cada péptido en suero a 37 °C y se tomaron alícuotas de 40 μL por triplicado a las 0, 1, 3, 6, 10, 16 y 24 h. Se extinguió cada alícuota de suero con 40 μL de urea 6 M y se incubaron durante 10 min a 4 °C. Después, se extinguió cada alícuota de suero con 40 μL de ácido tricloroacético al 20% y se incubaron durante otros 10 min a 4 °C para precipitar las proteínas séricas. Se centrifugaron las muestras a 14000 g durante 10 min, y se analizaron 100 μL del sobrenadante con RP-HPLC utilizando un gradiente lineal de disolvente B (velocidad de flujo de 0.3 mL/min). Las muestras de control contenían una cantidad equivalente de péptidos en solución salina tamponada con fosfato sometidas al mismo procedimiento de tratamiento. Se detectó la recuperación de péptidos en porcentaje mediante integración a 215 nm.

15 Modelos de animales. Todos los animales se manipularon siguiendo estrictamente la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. Todos los estudios con animales se realizaron según protocolos aprobados por el Fred Hutchinson Cancer Research Center's Institute of Animal Care and Use Committee. Se utilizó un modelo de ratón autóctono de meduloblastoma, ND2:SmoA1 (A.R. Hallahan, *et al.*, "The SmoA1 Mouse Model Reveals That Notch Signaling is Critical for the Growth and Survival of Sonic Hedgehog-Induced Medulloblastomas", *Cancer Research* 64:7794-7800, 2004. B.A. Hatton, *et al.* "The Smo/Smo Model: Hedgehog-Induced Medulloblastoma With 90% Incidence and Leptomeningeal Spread," *Cancer Research* 68:1768-1776, 2008), con un contexto C57b1/6 para evaluar la especificidad de CTX ciclizada: Cy5.5, K15A_K23A CTX: Cy5.5, y K15R_K23R CTX: Cy5.5. Se seleccionaron ratones hemicigóticos u homocigóticos (denominados ND2:SmoA1) con meduloblastoma sintomático para su inclusión en estos estudios. Se detectaron síntomas utilizando una evaluación en jaula en campo abierto. Los síntomas incluyen inclinación de cabeza, postura encorvada, ataxia, cráneo prominente, y pérdida de peso.

20 Obtención de imágenes ex vivo. A animales ND2:SmoA1 que mostraban síntomas de meduloblastoma se les inyectaron 50 μL de K15A_K23A CTX: Cy5.5 o K15R_K23R CTX: Cy5.5 40 μM a través de la vena de la cola. Se sacrificaron los ratones utilizando inhalación de CO₂ tres días tras la inyección y se obtuvieron imágenes biofotónicas *ex vivo* de su cerebro utilizando el sistema de obtención de imágenes Xenogen Spectrum (Caliper). Después se congelaron los cerebros en compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) Tissue-Tek (Sakura), se cortaron en secciones de 12 μm y se tiñeron con hemotoxilina y eosina (H&E) según procedimientos convencionales.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Fred Hutchinson Cancer Research Center
Olson, James M.
- <120> VARIANTES DE CLOROTOXINA, CONJUGADOS Y MÉTODOS PARA SU UTILIZACIÓN
- 10 <130> FHCR136231
- <150> Documento US 61/333,556
<151> 11-05-2010
- 15 <160> 6
- <170> Patent In versión 3.5
- <210> 1
<211> 36
20 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Cys**
1 5 10 15
- Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Cys Tyr Gly Pro Gln**
20 25 30
- Cys Leu Cys Arg**
35
- 25 <210> 2
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15) .. (15)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23) .. (23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 40 <400> 2

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

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

Cys Leu Cys Arg
 35

<210> 3
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3
 Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Ala Cys
 1 5 10 15

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

Cys Leu Cys Arg
 35

<210> 4
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 4
 Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Arg Cys
 1 5 10 15

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

Cys Leu Cys Arg
 35

<210> 5
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 5

20

ES 2 601 182 T3

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

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

Cys Leu Cys Arg
35

<210> 6

<211> 36

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

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

Cys Leu Cys Arg
35

10

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de clorotoxina que comprende:
- 5 (i) un péptido de clorotoxina que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, en la que Lys15 y Lys23 están sustituidos por un aminoácido distinto de lisina para proporcionar una clorotoxina modificada que tiene un único residuo de lisina, Lys27; y
- (ii) un marcador fluorescente seleccionado de DyLight-680, DyLight-750, VivoTag-750, DyLight-800, VivoTag-680, y verde de indocianina;
- 10 en el que el péptido de clorotoxina está acoplado covalentemente al marcador fluorescente a través del residuo de lisina, y dicho péptido de clorotoxina se une a sitios de unión a clorotoxina expresados por células cancerosas.
2. Conjugado de clorotoxina según la reivindicación 1, en el que el polipéptido variante de clorotoxina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que:
- 15 (i) el residuo de lisina K15 y/o el residuo de lisina K23 están sustituidos independientemente por un aminoácido básico, no polar, polar o ácido, o un aminoácido no natural, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido del mismo;
- (ii) los residuos de lisina K15 y K23 están sustituidos por alanina o arginina;
- (iii) el residuo de lisina K15 está sustituido por alanina y K23 está sustituido por arginina; o
- 20 (iv) el residuo de lisina K15 está sustituido por arginina y K23 está sustituido por alanina.
3. Conjugado de clorotoxina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para su utilización en:
- (a) detectar células cancerosas *in vivo*;
- (b) detectar y eliminar células cancerosas *in vivo*;
- 25 (c) detectar un tejido canceroso o tumoral en un individuo, en el que el conjugado de clorotoxina es para su administración al individuo de tal manera que el conjugado de clorotoxina se une al tejido canceroso o tumoral; o
- (d) obtener imágenes de tejido canceroso o tumoral en un individuo, en el que el conjugado de clorotoxina es para su administración al individuo de tal manera que el conjugado de clorotoxina se une al tejido canceroso o tumoral.
- 30 4. Utilización del conjugado de clorotoxina según la reivindicación 1 ó 2 para la fabricación de un medicamento para:
- (a) detectar u obtener imágenes de células cancerosas *in vivo*; o
- (b) detectar y eliminar, u obtener imágenes y eliminar células cancerosas *in vivo*.
5. Conjugado de clorotoxina para su utilización según la reivindicación 3, o utilización del conjugado de clorotoxina según la reivindicación 4, en el que la unión del conjugado de clorotoxina al tejido canceroso o tumoral en el cuerpo del individuo:
- 35 (a) se detecta midiendo un nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel de unión elevado con respecto a tejido normal es indicativo de que el tejido es tejido canceroso o tumoral; o
- (b) se obtienen imágenes de la misma midiendo un nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel
- 40 de unión elevado con respecto a tejido normal es indicativo de que el tejido es tejido canceroso o tumoral.
6. Método *in vitro* o *ex vivo* para detectar u obtener imágenes de tejido canceroso con un conjugado de clorotoxina o una composición del mismo, en el que el conjugado de clorotoxina comprende el conjugado de clorotoxina según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo dicho método:
- 45 (a) poner en contacto un tejido con el conjugado de clorotoxina o la composición del mismo; y
- (b) analizar el tejido para detectar la unión del conjugado de clorotoxina a células cancerosas dentro del tejido.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el análisis comprende medir un nivel de unión del conjugado de clorotoxina, en el que un nivel de unión elevado con respecto a tejido normal es indicativo de que el tejido es neoplásico.
- 50 8. Método según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el conjugado de clorotoxina se une a células cancerosas dentro del tejido.
9. Conjugado de clorotoxina según la reivindicación 1 ó 2, método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, clorotoxina para su utilización según la reivindicación 3 ó 5 o utilización de una clorotoxina según la reivindicación 4 ó 5, en el que el conjugado de clorotoxina comprende un polipéptido variante de clorotoxina que se ha conjugado con verde de indocianina.
- 55



Fig.1.

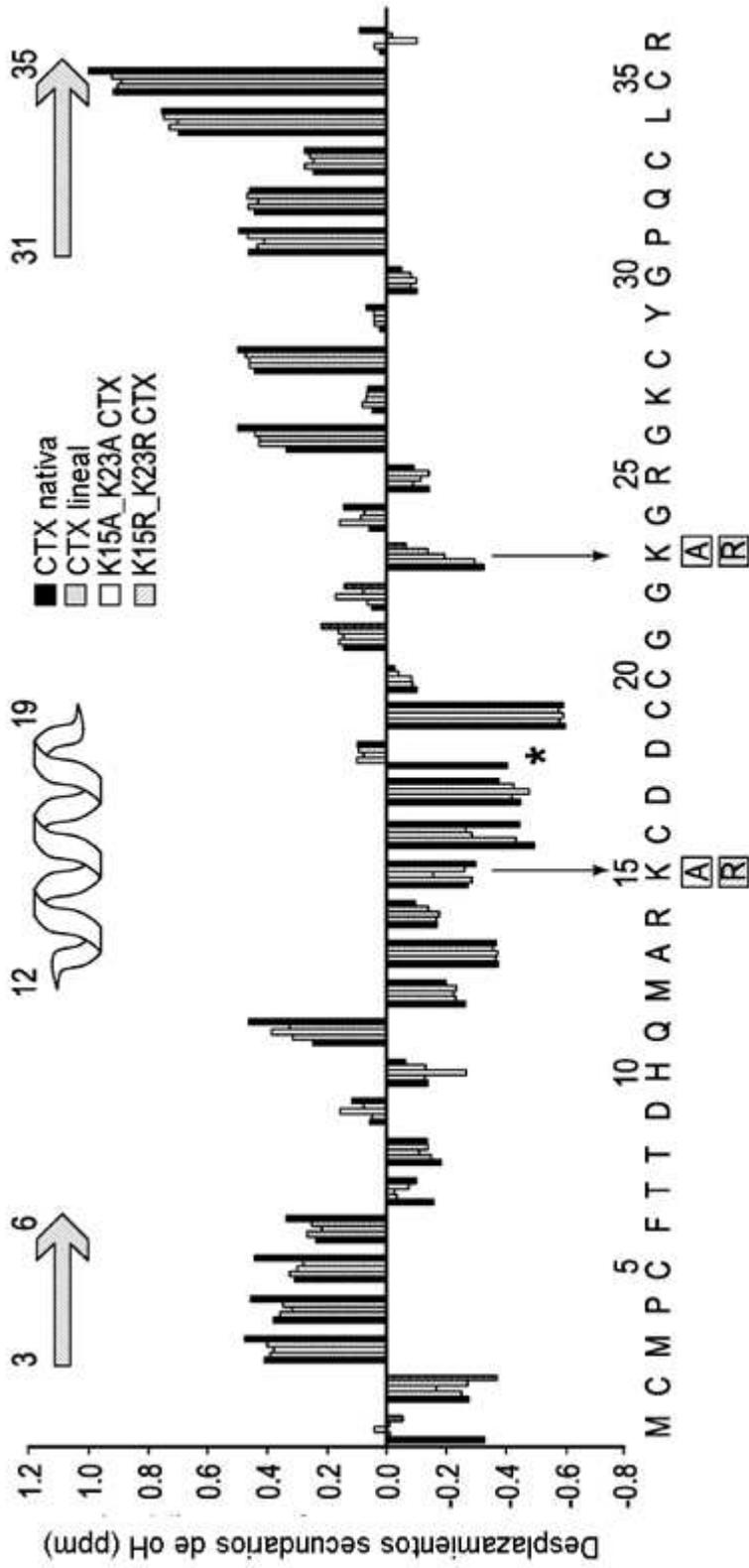


Fig.2.

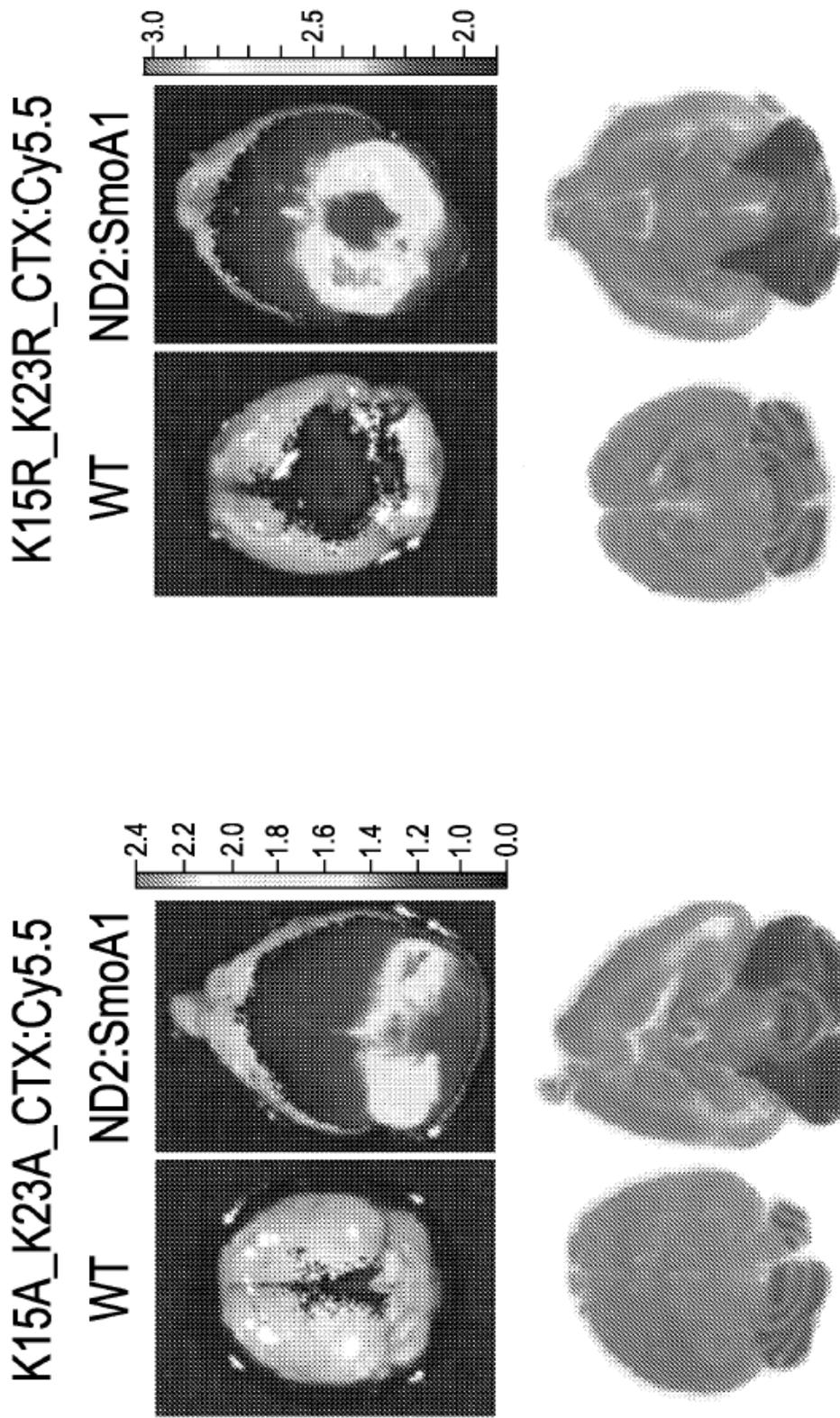


Fig. 2A.

Fig. 2B.