

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 871**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2011 PCT/US2011/023823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11097533**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2011 E 11740464 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2531206**

54 Título: **Polipéptidos clorotoxina y conjugados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

04.02.2010 US 301615 P

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

24.10.2017

73 Titular/es:

**MORPHOTEK, INC. (100.0%)
210 Welsh Pool Road
Exton, PA 19341, US**

72 Inventor/es:

**SENTISSI, ABDELLAH y
JACOBY, DOUGLAS, B.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 638 871 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

Polipéptidos clorotoxina y conjugados y usos de los mismos.

5 Antecedentes

La clorotoxina es un componente peptídico del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* que se ha demostrado que se une específicamente a las células tumorales. La clorotoxina ha sido utilizada como agente de transporte para transportar agentes citotóxicos y/o de imagen a una diversidad de tumores, incluyendo tumores metastásicos y tumores cerebrales tales como el glioma maligno. Por ejemplo, la clorotoxina ha sido conjugada con el isótopo radioactivo yodo-131 y se ha demostrado que dichos conjugados de clorotoxina resultan ser eficaces agentes terapéuticos antitumorales. Otros conjugados de clorotoxina, incluyendo fusiones de proteínas, tales como la proteína de fusión clorotoxina-CST unida a la saporina, también se ha demostrado que resultan en una eliminación significativa y selectiva de las células tumorales.

En la técnica anterior, Tytgat et al. FEBS letters, 441(3): 387-391 da a conocer la purificación y caracterización parcial de un péptido de tipo insectotoxina procedente del veneno del escorpión *Parabuthus schlechteri*. El documento nº WO 03/101474 da a conocer una toxina de insecto del escorpión *Mesobuthus eupeus*. El documento nº US 2009/004105 da a conocer clorotoxina marcada con F.

20 Descripción resumida

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido clorotoxina que presenta no más de una lisina, en el que el polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 85% respecto a la SEC ID nº y en el que el polipéptido clorotoxina se une selectivamente a una célula tumoral.

Conjugado que comprende por lo menos un polipéptido clorotoxina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores asociado a por lo menos una fracción terapéutica, en el que la fracción terapéutica se asocia covalentemente al polipéptido clorotoxina mediante una lisina única en caso de hallarse presente o mediante el extremo N-terminal del polipéptido clorotoxina.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de por lo menos un conjugado del primer aspecto, o una sal fisiológicamente tolerable del mismo, y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Composición que comprende el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 o la composición farmacéutica según la reivindicación 13 para la utilización en un método de tratamiento de: (a) un individuo que presenta o que se sospecha que presenta un tumor, de manera que el conjugado se une específicamente al tumor, o (b) un individuo que presenta o que se sospecha que presenta una enfermedad o condición caracterizada por angiogénesis aberrante, de manera que el conjugado de clorotoxina reduce el grado de angiogénesis.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un conjugado que comprende por lo menos un polipéptido clorotoxina del primer aspecto, en el que el polipéptido clorotoxina se encuentra asociado covalentemente a por lo menos una fracción detectable o fracción de transporte mediante la lisina única en caso de hallarse presente o mediante el extremo N-terminal del polipéptido clorotoxina.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona el conjugado del quinto aspecto, para la utilización en un método de obtención de imágenes de un tejido o en un método de detección de cáncer en un sujeto. Las características preferentes de la invención se proporcionan en las reivindicaciones dependientes en la presente memoria.

La clorotoxina puede conjugarse potencialmente a cualquiera de entre una amplia diversidad de agentes, incluyendo agentes citotóxicos y/o de obtención de imágenes. Aunque los conjugados de clorotoxina disponibles actualmente han mostrado propiedades antitumorales, la presente invención comprende el reconocimiento de que un repertorio más grande de conjugados de clorotoxina podría ofrecer muchas ventajas. A título de ejemplo, diferentes conjugados de clorotoxina podrían presentar sus propios conjuntos de propiedades farmacocinéticas que podrían resultar particularmente deseables para un tipo tumoral y/o paciente dado. Además, la presente invención identifica una fuente previamente no documentada de un problema potencial con determinados tipos de conjugado de clorotoxina, que partiendo del hecho de que el polipéptido clorotoxina de tipo salvaje (y muchas variantes de este polipéptido) contienen más de un sitio en el que puede producirse la conjugación. Por lo tanto, la presente invención proporciona la idea de que las reacciones químicas para generar conjugados con clorotoxina con frecuencia resultan en mezclas de especies de conjugado. En por lo menos algunas realizaciones, dichas especies diferentes pueden presentar diferentes propiedades. Además, los esfuerzos por reproducir los resultados obtenidos con dichas mezclas de conjugados de clorotoxina pueden resultar mermados por los retos de reproducir la distribución de las diferentes especies en la preparación.

El control de calidad, e incluso el análisis, puede resultar difícil o imposible.

La presente invención proporciona nuevos tipos de conjugado de clorotoxina e identifica el origen de los problemas que pueden aparecer con otros conjugados de clorotoxina. Es decir, la presente invención reconoce que muchos conjugados de clorotoxina anteriores se preparan mediante la conjugación química de una fracción o entidad de interés con un polipéptido clorotoxina. Según la presente invención, se reconoce que en por lo menos algunos casos dichos enfoques generan poblaciones mixtas de conjugados en las que las fracciones o entidades de interés se conjugan con clorotoxina en diferentes puntos o localizaciones. La presente invención comprende el reconocimiento de que dichas poblaciones mixtas podrían resultar difíciles de caracterizar y/o reproducir y podrían mostrar propiedades diferentes (por ejemplo propiedades farmacocinéticas), diferencias que podrían no ser predecibles. La presente invención comprende el reconocimiento de que las preparaciones que contienen conjugados de clorotoxina de una única especie podrían resultar más deseables que las preparaciones que contienen mezclas de conjugados, por ejemplo en aplicaciones terapéuticas y/o diagnósticas.

La presente invención proporciona además soluciones a dicho problema de origen identificado. Por ejemplo, la presente invención proporciona polipéptidos de clorotoxina de contenido reducido de lisina que pueden generar conjugados de especie única. En determinadas realizaciones se proporcionan polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina. En diversos aspectos, se proporcionan conjugados de clorotoxina que comprenden polipéptidos de clorotoxina que presentan no más de una lisina disponible como sitio para la conjugación ("conjugados de clorotoxina monolisina"), composiciones farmacéuticas que comprenden dichos conjugados y métodos de utilización de dichos conjugados. En algunas realizaciones se proporcionan polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina que no presentan residuos de lisina.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de preparación y de utilización de polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina y conjugados de los mismos. En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos de clorotoxina de contenido reducido de lisina y/o conjugados de los mismos que pueden utilizarse en medicina (por ejemplo en diversos contextos terapéuticos y/o diagnósticos).

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "aprox." y "aproximadamente" en referencia a un número se utilizan en la presente memoria incluyendo los números que se encuentran comprendidos en un intervalo de 20%, 10%, 5% o 1% en ambas direcciones (hacia arriba o hacia abajo) respecto al número, a menos que se indique lo contrario o que, de otro modo, resulte evidente a partir del contexto (excepto en el caso de que dicho número exceda 100% de un valor posible).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "elemento de secuencia característico" o "elemento de secuencia" se refiere a un tramo de aminoácidos contiguos, típicamente por lo menos 5 aminoácidos, por ejemplo por lo menos 5 a 50, 5 a 25, 5 a 15 o 5 a 10 aminoácidos, que muestran una identidad de por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad respecto a otro polipéptido. En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característico participa o confiere una función al polipéptido. En algunas realizaciones, los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina comprenden un elemento de secuencia característico. En algunas de dichas realizaciones, los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina comprenden un elemento de secuencia característico que es TTDHQMAR (SEC ID nº 29)

Las expresiones "quimioterapéutico", "agente anticáncer" y "fármaco anticáncer" en la presente memoria se utilizan intercambiamente. Se refieren a medicaciones que se utilizan para tratar el cáncer o condiciones cancerosas. Los fármacos anticáncer se clasifican convencionalmente en los grupos siguientes: isótopos radioactivos (por ejemplo yodo-131, lutecio-177, renio-188 o itrio-90), toxinas (por ejemplo diftérica, de Pseudomonas, ricina o gelonina), enzimas, enzimas que activan profármacos, fármacos radiosensibilizadores, los ARN interfirientes, superantígenos, agentes antiangiogénicos, agentes alquilantes, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, alcaloides vegetales, antibióticos intercalantes, inhibidores de aromatasas, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas y antiandrógenos. BCNU, cisplatino, gemcitabina, hidroxiurea, paclitaxel, temozolomida, topotecán, fluorouracilo, vincristina, vinblastina, procarbazona, decarbazina, alretamina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina fosfato, cladribina, pentostatina, citarabina, azacitidina, etopósido, tenipósido, irinotecán, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, dactinomicina, idarrubicina, plicamicina, mitomicina, bleomisina, tamoxifeno, flutamida, leuprólido, goserelina, aminoglutimida, anastrozol, amsacrina, asparaginasa, mitoxantrona, mitotano y amifostina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "clorotoxina" se refiere a un péptido de 36 aminoácidos de longitud que presenta la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 1). El término "clorotoxina" tal como se utiliza en la presente memoria comprende clorotoxina que ha sido aislada a partir del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus* u otros organismos en los que puede encontrarse la clorotoxina, así como clorotoxina recombinante y sintética.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "conjugado de clorotoxina" se refiere a un polipéptido clorotoxina asociado covalentemente a una o más entidades o fracciones de interés. En algunas realizaciones, la entidad de interés no es un polipéptido y/o no está unido dentro de la cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, la entidad de interés se une a una cadena lateral de aminoácidos. En algunas realizaciones, la entidad de interés se une al polipéptido clorotoxina mediante un residuo de lisina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polipéptido clorotoxina" se refiere a un polipéptido que muestra una identidad de secuencia global de por lo menos 45% respecto a la clorotoxina (SEC ID nº 1) y que presenta una longitud de entre veinticuatro y cuarenta aminoácidos, ambos inclusive. El polipéptido clorotoxina puede presentar una identidad de secuencia global de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 86%, de por lo menos 87%, de por lo menos 88%, de por lo menos 89%, de por lo menos 90%, de por lo menos 91%, de por lo menos 92%, de por lo menos 93%, de por lo menos 94%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97% o de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la SEC ID nº 1.

En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 91% respecto a la SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 94% respecto a la SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 97% respecto a la SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina comparte además por lo menos un elemento de secuencia característico con la SEC ID nº 1. En algunas realizaciones, el elemento de secuencia característico es TTDHQMAR (SEC ID nº 29). En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina presenta una longitud de entre veinticuatro y cuarenta aminoácidos, ambos inclusive. En algunas realizaciones, un "polipéptido clorotoxina" incluye uno o más tramos adicionales de aminoácidos, típicamente en el extremo C-terminal y/o N-terminal y/o como bloque discreto insertado dentro de una secuencia. Típicamente, dichos tramos adicionales presentan una longitud de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 1.000 aminoácidos. En algunas realizaciones, los tramos adicionales presentan una longitud de aproximadamente 3 a 100, 3 a 90, 3 a 80, 3 a 70, 3 a 60, 3 a 50, 3 a 40, 3 a 30 o 3 a 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, los tramos adicionales presentan una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos o menos, de aproximadamente 15 aminoácidos o menos o de aproximadamente 10 aminoácidos o menos. En algunas realizaciones, el tramo adicional comprende una o más etiquetas conocidas. En algunas realizaciones, el tramo adicional comprende un agente citotóxico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes activos en el mismo sujeto, de manera que el sujeto se encuentre expuesto a ambos agentes simultáneamente. El experto ordinario en la materia apreciará que puede administrarse deseablemente cualquier agente individual en una única dosis, o en múltiples dosis, por ejemplo espaciadas durante intervalos predeterminados o en un patrón predeterminado. La terapia de combinación no requiere que se administren las dosis individuales de los dos o más agentes activos simultáneamente, con la condición de que el sujeto que recibe las dosis se encuentre expuesto simultáneamente a los agentes. La terapia de combinación tampoco requiere que los dos o más agentes activos se administren por la misma vía. En algunas realizaciones, uno o todos los dos o más agentes activos administrados en la terapia de combinación se administren a una dosis y/o frecuencia que está reducida respecto a su dosis o frecuencia al administrarlos solos.

La expresión "correspondiente a" al utilizarla para describir posiciones o sitios dentro de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se utiliza en la presente memoria tal como se entiende en la técnica. Tal como es bien conocido de la técnica, pueden alinearse dos o más secuencias de aminoácidos o de nucleótidos utilizando herramientas bioinformáticas estándares, entre ellas programas tales como BLAST, ClustalX, Sequencher, etc. Aunque las dos o más secuencias pueden no ser exactamente correspondientes y/o no presentar la misma longitud, todavía puede llevarse a cabo una alineación de las secuencias y, en caso de resultar deseable, generarse una secuencia "de consenso". En efecto, los programas y algoritmos utilizados para las alineaciones típicamente toleran niveles definibles de diferencias, incluyendo inserciones, deleciones, inversiones, polimorfismos, mutaciones puntuales, etc. Dichas alineaciones pueden ayudar a determinar qué posiciones en una secuencia de nucleótidos corresponden a qué posiciones en otras secuencias de nucleótidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "régimen de administración" se refiere a un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de una) que se administran individualmente separadas por periodos de tiempo. El conjunto recomendado de dosis (es decir, las cantidades, tiempos, vía de administración, etc.) para un agente o composición farmacéutica particular constituye su régimen de administración.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "cantidad eficaz" y "dosis eficaz" se refieren a cualquier cantidad o dosis de un compuesto o composiciones que resulta suficiente para satisfacer su propósito o propósitos pretendidos, es decir, una respuesta biológica o medicinal deseada en un tejido o sujeto en una proporción de beneficio/riesgo aceptable. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la presente invención, el propósito o propósitos pueden ser: inhibir la angiogénesis, causar la regresión de la neovasculatura, interferir con la actividad de otra molécula bioactiva, causar la regresión de un tumor, inhibir las metástasis, reducir el grado de las metástasis,

etc. El propósito deseado relevante puede ser objetivo (es decir, medible mediante algún ensayo o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto proporciona una indicación o siente un efecto). Comúnmente se administra una cantidad terapéuticamente eficaz en un régimen de administración que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier agente farmacéutico particular, puede variar la cantidad terapéuticamente eficaz (y/o la dosis unitaria apropiada en un régimen de administración eficaz), por ejemplo dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o la dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno bajo tratamiento y la gravedad del trastorno, la actividad del agente farmacéutico específico utilizado, la composición específica utilizada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente, el tiempo de administración, la vía de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo del agente farmacéutico específico utilizado, la duración del tratamiento y factores similares, tal como es bien conocido de las ciencias médicas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones “fluoróforo”, “fracción fluorescente”, “marcaje fluorescente”, “pigmento fluorescente” y “fracción de marcaje fluorescente” se utilizan intercambiamente en la presente memoria. Se refieren a una molécula que, en solución y tras la excitación con luz de longitud de onda apropiada, emite luz. Resultan adecuados numerosos pigmentos fluorescentes de una amplia diversidad de estructuras y características para la utilización en la práctica de la presente invención. De manera similar, se conocen métodos y similares para marcar fluorescentemente ácidos nucleicos (ver, por ejemplo, R.P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 5a ed., a 1994, Molecular Probes, Inc.). Al seleccionar el fluoróforo, con frecuencia resulta deseable que la molécula fluorescente absorba luz y emita fluorescencia con eficiencia elevada (es decir, un elevado coeficiente de absorción molar y rendimiento cuántico de fluorescencia, respectivamente) y es fotoestable (es decir, no experimenta una degradación significativa con la excitación con luz dentro del tiempo necesario para llevar a cabo el análisis).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “inhibir” se refiere a evitar que ocurra algún suceso, a retrasar la incidencia de un suceso y/o a reducir el grado o probabilidad de un suceso. De esta manera, “inhibir la angiogénesis” e “inhibir la formación de neovascularización” pretende comprender prevenir, retrasar y/o reducir la probabilidad de que se produzca la angiogénesis, así como reducir el número, tasa de crecimiento, tamaño, etc. de los neovasos.

Las expresiones “marcado” y “marcado con un agente o fracción detectable” se utilizan en la presente memoria intercambiamente para especificar que una entidad (por ejemplo un polipéptido clorotoxina o conjugado de clorotoxina de contenido reducido de lisina) puede visualizarse, por ejemplo tras la unión a otra entidad (por ejemplo un tejido tumoral neoplásico). El agente o fracción detectable puede seleccionarse de manera que genere una señal que pueda medirse y la intensidad del cual se relacione (por ejemplo sea proporcional a) la cantidad de entidad unida. Se conoce de la técnica una amplia diversidad de sistemas para marcar y/o detectar proteínas y péptidos. Pueden prepararse proteínas y péptido marcados mediante la incorporación o la conjugación con un marcaje que es detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros medios. Un marcaje o fracción de marcaje puede ser directamente detectable (es decir, no requiere ninguna reacción o manipulación adicional para ser detectable, por ejemplo un fluoróforo es directamente detectable) o puede ser indirectamente detectable (es decir, se convierte en detectable mediante la reacción o la unión a otra entidad que es detectable, por ejemplo un hapteno es detectable mediante inmunotinción tras la reacción con un anticuerpo apropiado que comprende un informador, tal como un fluoróforo). Entre los agentes detectables adecuados se incluyen, aunque sin limitación, radionucleidos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, marcajes colorimétricos, marcajes magnéticos, haptenos, balizas moleculares, balizas de aptámeros, y similares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “degeneración macular” se refiere a una condición médica que resulta en la pérdida de visión en el centro del campo visual (la mácula) debido a daños en la retina. Se conoce la existencia de varias formas de degeneración macular, y a menos que se especifique, la expresión “degeneración macular” incluye todas las formas. La “degeneración macular húmeda” (también conocida como forma neovascular o exudativa) se refiere a la degeneración macular que implica el crecimiento de vasos sanguíneos de la coroides, situada detrás de la retina. En ocasiones en la degeneración macular húmeda, la retina llega a desprenderse. En la degeneración macular seca (también conocida como forma no exudativa), los residuos celulares denominados drusas se acumulan entre la retina y la coroides pero no se produce formación de vasos sanguíneos. La “degeneración macular asociada a la edad” (DMAE) se refiere a la forma más común de degeneración macular, que típicamente se inicia más tarde en la vida, con depósitos amarillos característicos en la mácula. La DMAE puede producirse en las formas húmeda y seca de degeneración macular.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “metástasis” (en ocasiones abreviado “mets”, en plural “metástasis”) se refiere a la extensión de células tumorales de un órgano o tejido a otra localización. El término también se refiere a tejido tumoral que se forma en una nueva localización como resultado de la metástasis. Un “cáncer metastásico” es un cáncer que se extiende desde su localización original, o primaria, y que también puede denominarse “cáncer secundario” o “tumor secundario”. Generalmente, los tumores metastásicos se denominan según el tejido del tumor primario a partir del cual se originan. De esta manera, un cáncer de mama que se ha

metastizado al pulmón puede denominarse “cáncer de mama metastásico”, aunque algunas células de cáncer se localicen en el pulmón.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “polipéptido clorotoxina monolisina” se refiere a un polipéptido clorotoxina que presenta únicamente un residuo de lisina que se encuentra disponible como sitio para la conjugación. En algunas realizaciones, los polipéptidos clorotoxina monolisina presentan únicamente un residuo de lisina. En algunas realizaciones, los polipéptidos clorotoxina monolisina presentan más de un residuo de lisina pero únicamente uno de los residuos de lisina se encuentra disponible como sitio para la conjugación. En algunas realizaciones, uno o más grupos de bloqueo en algunas lisinas provocan que no resulten disponibles como sitio para la conjugación.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “neovasculatura” se refiere a vasos sanguíneos de nueva formación que no han madurado totalmente todavía, es decir, que no presentan un revestimiento endotelial totalmente formado con uniones celulares estrechas o una capa completa de células de músculo liso circundante. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “neovaso” se utiliza para referirse a un vaso sanguíneo en la neovasculatura.

20 Las expresiones “agente farmacéutico”, “agente terapéutico” y “fármaco” se utilizan intercambiamente en la presente memoria. Se refieren a una sustancia, molécula, compuesto, agente, factor o composición que resulta eficaz en el tratamiento, inhibición y/o detección de una enfermedad, trastorno o condición clínica.

25 Una “composición farmacéutica” se define en la presente memoria como una composición que comprende una cantidad eficaz de por lo menos un ingrediente activo (por ejemplo un polipéptido clorotoxina o conjugado de clorotoxina de contenido reducido de lisina que puede o no encontrarse marcado) y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “prevenir” utilizado en referencia a la acción de un agente respecto a un proceso (por ejemplo la angiogénesis, la metástasis, la progresión del cáncer, etc.) se refiere a reducir el grado y/o retrasar la aparición de dicho proceso en el caso de que el agente (por ejemplo un agente terapéutico, tal como un conjugado de clorotoxina) se administre antes del desarrollo de uno o más síntomas o atributos asociados al proceso.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “tumor primario” se refiere a un tumor que se encuentra en el sitio original en el que apareció en primer lugar el tumor, es decir, que no ha llegado al sitio por extensión desde otro sitio.

40 El término “profármaco” se refiere a un compuesto que, tras la administración in vivo, resulta metabolizado o, de otro modo convertido en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa del compuesto. Puede diseñarse un profármaco para que altere la actividad metabólica o las características de transporte de un compuesto de enmascarar los efectos secundarios o la toxicidad, a fin de mejorar el sabor de un compuesto y/o de alterar otras características o propiedades de un compuesto. En virtud de los conocimientos sobre los procesos farmacodinámicos y metabolismo de los fármacos in vivo, tras la identificación de un compuesto farmacéuticamente activo, el experto en las técnicas farmacéuticas generalmente podrá diseñar profármacos del compuesto (Nogrady, "Medicinal Chemistry A Biochemical Approach", 1985, Oxford University Press: N.Y., páginas 388 a 392). Los procedimientos para la selección y preparación de profármacos adecuados también son conocidos de la técnica. En algunas realizaciones, un profármaco es un compuesto la conversión a su forma activa del cual (tras la administración in vivo) implica la catálisis enzimática.

50 Los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido” se utilizan en la presente memoria intercambiamente y se refieren a secuencias de aminoácidos de una diversidad de longitudes, en sus formas neutras (no cargadas) o como sales, y no modificados o modificados mediante glucosilación, la oxidación de cadenas laterales o la fosforilación. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es la proteína nativa de longitud completa. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos es un fragmento más pequeño de la proteína de longitud completa. En todavía otras realizaciones, se modifica la secuencia de aminoácidos mediante sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como unidades glucosilo, lípidos o iones inorgánicos, tales como fosfatos, así como modificaciones relacionadas con la conversión química de las cadenas, tal como la oxidación de los grupos sulfhidrilo. De esta manera, el término “proteína” (o sus términos equivalentes) pretende incluir la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, sujeta a dichas modificaciones que no modifica sus propiedades específicas. En particular, el término “proteína” comprende isoformas de proteína, es decir, variantes que están codificadas por el mismo gen pero que difieren en su pl o PM, o en ambos. Dichas isoformas pueden diferir en su secuencia de aminoácidos (por ejemplo como resultado del procesamiento alternativo o una proteólisis limitada), o alternativamente, pueden surgir de una modificación post-traduccional diferente (por ejemplo la glucosilación, acilación o fosforilación).

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina” se refiere a un polipéptido clorotoxina que presenta menos residuos de lisina que la clorotoxina (SEC ID nº 1) y/o

5 presenta menos residuos de lisina disponibles como sitio para la conjugación que presenta la clorotoxina. En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina no presenta más de un residuo de lisina. En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina presenta únicamente un residuo de lisina. En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina presenta no más de un residuo de lisina disponible como sitio para la conjugación. En algunas realizaciones, la totalidad excepto un residuo de lisina en un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina ha sido modificada de manera que no se encuentren disponibles como sitio para la conjugación. En algunas realizaciones, todos los residuos de lisina en un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina han sido modificados de manera que no se encuentran disponibles como sitio para la conjugación. En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina contiene un único sitio disponible para la conjugación.

10 El término “regresión” utilizado para referirse a vasos sanguíneos y/o la vasculatura (incluyendo la neovasculatura y/o los neovasos) se utiliza en la presente memoria para referirse a la retracción, encogimiento, etc.

15 Los términos “sujeto” e “individuo” se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria. Se refieren a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo ratón, rata, conejo, perro, gato, vaca, cerdo, oveja, caballo o primate) que puede verse afectado o que es susceptible de resultar afectado por una enfermedad o trastorno (por ejemplo cáncer, degeneración macular, etc.) pero que puede o no presentar la enfermedad o trastorno. En muchas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En muchas realizaciones, el sujeto es un paciente. A menos que se indique lo contrario, los términos “individuo” y “sujeto” no se refieren a una edad particular y, de esta manera, comprenden adultos, niños y recién nacidos.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “susceptible” se refiere a que presenta un riesgo incrementado y/o una propensión a (típicamente basada en una predisposición genética, factores ambientales, historial personal o combinaciones de los mismos) algo, es decir, una enfermedad, trastorno o condición (tal como, por ejemplo, cáncer, cáncer metastásico, degeneración macular, artritis reumatoide, etc.) que la observada en la población general. El término tiene en consideración que un individuo “susceptible” de una condición podría no ser diagnosticado nunca con la condición.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “administración sistémica” se refiere a la administración de un agente de manera que el agente se distribuye ampliamente en el cuerpo en cantidades significativas y presenta un efecto biológico, por ejemplo su efecto deseado, en la sangre y/o alcanza su sitio de acción deseado por el sistema vascular. Entre las vías sistémicas de administración típicas se incluyen la administración mediante: (1) la introducción del agente directamente en el sistema vascular, o (2) la administración oral, pulmonar o intramuscular, en la que el agente se adsorbe, entra en el sistema vascular y resulta transportado a uno o más sitios de acción deseados por la sangre.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “tratamiento” se refiere a aliviar, mejorar, aligerar, retrasar la aparición o inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia, de manera parcial o completa, de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o condición particular. Por ejemplo, “tratar” un cáncer puede referirse a inhibir la supervivencia, crecimiento y/o extensión de las células tumorales; prevenir, retrasar y/o reducir la probabilidad de aparición de metástasis y/o las recurrencias, y/o reducir el número, tasa de crecimiento, tamaño, etc., de las metástasis. El tratamiento puede administrarse en un sujeto que no muestra signos de una enfermedad, trastorno y/o condición y/o en un sujeto que muestra únicamente signos tempranos de una enfermedad, trastorno y/o condición con el propósito de reducir el riesgo de desarrollar la patología asociada a la enfermedad, trastorno y/o condición. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica en el sujeto.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “dosis unitaria” se refiere a una cantidad discreta de una composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada de un ingrediente activo (por ejemplo un agente terapéutico). La cantidad del ingrediente activo generalmente es igual a la dosis del ingrediente activo que se administraría en un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosis, tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de dicha dosis.

55 Descripción detallada de determinadas realizaciones de la invención

I. Polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina

60 Tal como se muestra en la Tabla 1 y se lista en la SEC ID nº 1, la clorotoxina es un péptido de 36 aminoácidos que presenta tres residuos de lisina, en las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1. La presente invención proporciona polipéptidos clorotoxina que presentan un número reducido de residuos de lisina (“polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina”). El polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina de la invención no presenta más de una lisina y presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID nº 1 en el aspecto de que el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 85% respecto a la SEC ID nº 1. El péptido clorotoxina puede presentar una longitud de entre veinticuatro y cuarenta residuos aminoácidos, ambos inclusive. En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido

reducido de lisina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 86%, de por lo menos 87%, de por lo menos 88%, de por lo menos 89%, de por lo menos 90%, de por lo menos 91%, de por lo menos 92%, de por lo menos 93%, de por lo menos 94%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98% o de por lo menos 99% respecto a la SEC ID nº 1.

5 En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 91% respecto a la SEC ID nº 1. Por ejemplo, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina puede presentar una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la clorotoxina en 33 de 36 residuos aminoácidos (es decir, una identidad de secuencia de ~91,7%). En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 94% respecto a la SEC ID nº 1, por ejemplo un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina puede ser idéntico en secuencia de aminoácidos a la clorotoxina en 34 de 36 residuos aminoácidos (es decir, una identidad de secuencia de ~94,4%). En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 97% respecto a la SEC ID nº 1. Por ejemplo, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina puede presentar una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la clorotoxina en 35 de 36 residuos aminoácidos (es decir, una identidad de secuencia de ~97,2%). En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina es y/o contiene un tramo de 33, 34, 35, 36, 37 o 38 aminoácidos la secuencia del cual corresponde con o presenta

20 una identidad de secuencia global de por lo menos 85%, de por lo menos 86%, de por lo menos 87%, de por lo menos 88%, de por lo menos 89%, de por lo menos 90%, de por lo menos 91%, de por lo menos 92%, de por lo menos 93%, de por lo menos 94%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98%, o de por lo menos 99% respecto a la identidad de secuencia global respecto a la secuencia de la clorotoxina.

25 La Tabla 1 ilustra la secuencia de la clorotoxina y secuencias de polipéptidos ejemplares de clorotoxina de contenido reducido de lisina. La Tabla 1 no pretende ser limitativa sino que, por el contrario, se utiliza para ilustrar determinados polipéptidos ejemplares de clorotoxina de contenido reducido de lisina proporcionados por la presente invención.

30 Tabla 1: secuencias de clorotoxina y de polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina ejemplares

Clorotoxina		
SEC ID nº	Observación	Secuencia (extremo N-terminal a extremo C-terminal)
1	Clorotoxina de longitud completa	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGKGR GKCYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
Polipéptidos de contenido reducido de lisina ejemplares		
SEC ID nº	Observación	Secuencia (extremo N-terminal a extremo C-terminal)
2	Ninguna lisina	MCMPC FTTDH QMARC DDCCG GGRGC YGPQC LCR 5 10 15 20 25 30
3	Ninguna lisina en las posiciones 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1; lisina en el extremo N-terminal	KMCMP CFTTD HQMAR CDDCC GGGRG CYGPQ CLCR 5 10 15 20 25 30
4	Ninguna lisina en las posiciones 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1; lisina en el extremo C-terminal	MCMPC FTTDH QMARC DDCCG GGRGC YGPQC LCRK 5 10 15 20 25 30
5	Lisinas en las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por alaninas	MCMPC FTTDH QMARA CDDCC GGAGR GACYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
6	Lisinas en las posiciones 15, 23 y 27 de SEC ID nº 1 sustituidas por argininas	MCMPC FTTDH QMARR CDDCC GGRGR GRCYG PQCLC 5 10 15 20 25 30 35

ES 2 638 871 T3

7	Lisinas en las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por alaninas; lisina en el extremo N-terminal	KMCMP CFTTD HQMAR ACDDC CGGAG RGACY GPQCL C 5 10 15 20 25 30 35
8	Lisinas en las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por argininas; lisina en el extremo N-terminal	KMCMP CFTTD HQMAR RCDDC CGGRG RGRGY GPQCL CR 5 10 15 20 25 30 35
9	Lisinas en las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por alaninas; lisina en el extremo C-terminal	MCMPC FTTDH QMARA CDDCC GGAGR GACYG PQCLC RK 5 10 15 20 25 30 35
10	Lisinas en las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por argininas; lisina en el extremo C-terminal	MCMPC FTTDH QMARR CDDCC GGRGR GRCYG PQCLC RK 5 10 15 20 25 30 35
11	Ninguna lisina en la posición 15 de la SEC ID nº 1	MCMPC FTTDH QMARC DDCCG GKGRG KCYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
12	Ninguna lisina en la posición 23 de la SEC ID nº 1	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGGRG KCYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
13	Ninguna lisina en la posición 27 de la SEC ID nº 1	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GKGRG GCYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
14	Ninguna lisina en las posiciones 15 y 23 de la SEC ID nº 1	MCMPC FTTDH QMARC DDCCG GGRGK CYGPQ CLCR 5 10 15 20 25 30
15	Ninguna lisina en las posiciones 15 y 27 de la SEC ID nº 1	MCMPC FTTDH QMARC DDCCG GKGRG CYGPQ CLCR 5 10 15 20 25 30
16	Ninguna lisina en las posiciones 23 y 27 de la SEC ID nº 1	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGGRG CYGPQ CLCR 5 10 15 20 25 30
17	Lisinas en las posiciones 15 y 23 de la SEC ID nº 1 sustituidas por alaninas	MCMPC FTTDH QMARA CDDCC GGAGR GKCYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
18	Lisinas en las posiciones 15 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por alaninas	MCMPC FTTDH QMARA CDDCC GKGRG GACYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
19	Lisinas en las posiciones 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por alaninas	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGAGR GACYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
20	Lisinas en las posiciones 15 y 23 de la SEC ID nº 1 sustituidas por argininas	MCMPC FTTDH QMARR CDDCC GGRGR GKCYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
21	Lisinas en las posiciones 15 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por argininas	MCMPC FTTDH QMARR CDDCC GKGRG RRCYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
22	Lisinas en las posiciones 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por argininas	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGRGR RRCYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35
23	Lisina en la posición 15 de la SEC ID nº 1 sustituida por arginina; lisina en la posición 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por alaninas	MCMPC FTTDH QMARR CDDCC GKGRG GACYG PQCLC R 5 10 15 20 25 30 35

24	Ninguna lisina en la posición 15 de la SEC ID nº 1; lisinas en las posiciones 23 y 27 de la SEC ID nº 1 sustituidas por argininas	MCMPC FTTDH QMARC DDCCG GAGRG ACYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
25	Ninguna lisina en la posición 23 de la SEC ID nº 1; lisinas en las posiciones 15 y 27 sustituidas por argininas	MCMPC FTTDH QMARA CDDCC GGGRG ACYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35
26	Ninguna lisina en la posición 27 de la SEC ID nº 1; lisinas en las posiciones 15 y 23 sustituidas por argininas	MCMPC FTTDH QMARR CDDCC GGRGR GCYGP QCLCR 5 10 15 20 25 30 35

En los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina de la invención no se encuentra disponible más de una lisina como sitio para la conjugación. En algunas realizaciones se encuentra disponible una lisina y se encuentra en una posición dentro del polipéptido clorotoxina que corresponde a una posición en la que se encuentra presente una lisina en la clorotoxina (es decir, la posición 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1). En algunas realizaciones, la lisina única se encuentra disponible en la posición 15 de la SEC ID 1. En algunas realizaciones, la lisina única se encuentra disponible en la posición 23 de la SEC ID 1. En algunas realizaciones, la lisina única se encuentra disponible en la posición 27 de la SEC ID 1. En algunas realizaciones, se encuentra disponible una única lisina en un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina de la presente invención en una posición correspondiente a un sitio en la clorotoxina que no contiene un residuo de lisina (es decir, no en una posición correspondiente a cualquiera de las posiciones 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1).

En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina no presenta por lo menos un residuo aminoácido correspondiente a la posición 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1.

En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina no presenta ningún residuo de lisina en absoluto (ver, por ejemplo, las SEC ID nº 2, 5, 6, 24, 25 y 26). En algunas realizaciones, falta un aminoácido en el que normalmente se encuentra un residuo de lisina en la clorotoxina. En algunas realizaciones, se sustituyen uno o más residuos de lisina normalmente presentes en la clorotoxina por otro residuo aminoácido y/o por un derivado de aminoácido. En otras palabras, por lo menos un residuo aminoácido en el polipéptido correspondiente la posición 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1 no es una lisina. Además de los otros diecinueve aminoácidos naturales de los que se componen típicamente los polipéptidos (alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, triptófano y valina), puede utilizarse una diversidad de sustitutos. Entre los ejemplos no limitativos de sustitutos se incluyen otros aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales tales como D-aminoácidos y derivados de aminoácidos. Entre los ejemplos no limitativos de otros aminoácidos naturales se incluyen beta-alanina, carnitina, citrulina, cistina, ácido gamma-aminobutírico, hidroxiprolina, ornitina y taurina (para ejemplos adicionales de aminoácidos naturales y de derivados de aminoácidos ver, por ejemplo, Wagner y Musso, "New Naturally Occurring Amino Acids", Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 22:816-828, 1983). En algunas realizaciones, se sustituye uno o más residuos de lisina por arginina y/o alanina.

En algunas realizaciones en las que un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina no presenta ningún residuo de lisina en absoluto, un extremo o ambos (es decir, el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal) del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina puede servir como sitio para la conjugación química. La disponibilidad del extremo o extremos puede depender de la reacción química de conjugación particular utilizada. En algunas realizaciones en las que un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina no presenta ningún residuo de lisina en absoluto, únicamente el grupo alfa-amino en el extremo N-terminal se encuentra disponible como sitio para la conjugación.

En realizaciones en las que se sustituye más de un residuo de lisina, puede utilizarse uno o más residuos aminoácidos o uno o más derivados de aminoácidos iguales o diferentes para sustituir los residuos de lisina. Ver, por ejemplo, las SEC ID nº 17 a 22 a modo de ejemplos no limitativos en los que se han utilizado los mismos residuos aminoácidos para sustituir los residuos de lisina y la SEC ID nº 23 a modo de ejemplo no limitativo en el que se han utilizado diferentes residuos aminoácidos para sustituir los residuos de lisina.

En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina presenta únicamente una lisina en la secuencia ("un polipéptido clorotoxina monolisina"). En algunas realizaciones, dicho polipéptido clorotoxina presenta un residuo de lisina en el que normalmente no se encuentra presente un residuo de lisina en la clorotoxina, por ejemplo en una posición correspondiente a la posición 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1 (ver, por ejemplo, las SEC ID nº 14 a 23 a modo de ejemplos no limitativos). En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina no presenta ningún residuo de lisina en el que normalmente no se encuentra presente un residuo de lisina en la clorotoxina (es decir, las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1) pero presenta un residuo de lisina en una posición que no corresponde con ninguna de las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1. Al igual que con

los polipéptidos clorotoxina que no presentan ninguna lisina en absoluto, los polipéptidos de clorotoxina monolisina pueden no presentar aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 y/o pueden presentar una sustitución por un aminoácido o derivado de aminoácido en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1.

En algunas realizaciones, uno o más residuos de lisina en un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina proporcionado en la presente memoria se torna no disponible como sitio para la conjugación aunque se encuentran presentes en el polipéptido clorotoxina. Por ejemplo, puede modificarse uno o más residuos de lisina covalente o no covalentemente de manera que uno o más residuos de lisina resulten bloqueados de la participación en la reacción química de conjugación, dejando no más de 1 residuo de lisina (es decir, un "contenido reducido" de lisina) disponible como sitio para la conjugación. Entre los ejemplos no limitativos de modificaciones covalentes de residuos de lisina que podrían utilizarse de esta manera se incluyen la pegilación (es decir, la modificación mediante la unión de un polímero polietilenglicol), la metilación (incluyendo la di- y tri-metilación) y la unión de otro u otros grupos alquilo. En determinadas realizaciones, se modifica uno o más residuos de lisina en el grupo NH₂ epsilon. Por ejemplo, en el caso de que se utilice un grupo R dado (por ejemplo un grupo butilo, propilo o etilo) para modificar covalentemente un residuo de lisina, el grupo NH₂ epsilon puede modificarse por un grupo NR₂ o NR₃.

La Tabla 2 presenta algunos ejemplos no limitativos de esquemas de modificación que podrían utilizarse para producir polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina.

Tabla 2: Esquemas ejemplares de modificación

SEC ID nº	Secuencia nuclear (extremo N-terminal a extremo C-terminal)	Posición(es) de el(los) residuo(s) de lisina
1	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GKGGR GKCYG PQCLC R	15, 23 y 27
	5 10 15 20 25 30 35	15 y 23
		15 y 27
		23 y 27
11	MCMPC FTTDH QMARC DDCCG GKGRG KCYGP QCLCR	22 y 26
	5 10 15 20 25 30 35	22
		26
12	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GGGRG KCYGP QCLCR	15 y 26
	5 10 15 20 25 30 35	15
		26
13	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GKGGR GCGYP QCLCR	15 y 23
	5 10 15 20 25 30 35	15
		23
27 (lisina añadida al extremo N-term.)	KMCMP CFTTD HQMAR KCDDC CGGKG RGKCY GPQCL CR	16,24 y 28
	5 10 15 20 25 30 35	
28 (lisina añadida al extremo C-term.)	MCMPC FTTDH QMARK CDDCC GKGGR GKCYG PQCLC RK	15,23 y 27
	5 10 15 20 25 30 35	

En determinadas realizaciones, el bloqueo de un residuo particular de lisina se consigue mediante la incorporación de una lisina modificada (en la que ya se encuentran bloqueados sitios disponibles para la conjugación) durante la etapa apropiada durante la síntesis del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina. Las lisinas modificadas se encuentran fácilmente disponibles comercialmente y pueden sintetizarse mediante métodos rutinarios conocidos de la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de lisinas modificadas que pueden utilizarse de esta manera se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, lisinas disustituidas o lisinas trisustituidas (por ejemplo N,N-R₂-lisina o N,N,N-R₃-lisina, en las que R es el grupo de bloqueo) y lisinas con moléculas de PEG cortas unidas a ellas. R puede ser cualquier grupo que unido covalentemente a la lisina servirá para bloquear la participación del residuo

de lisina en una reacción química de conjugación. Por ejemplo, los grupos alquilo (por ejemplo butilo, metilo y etilo) pueden servir como grupos de bloqueo. Por ejemplo, puede utilizarse N,N-dimetil-lisina y/o N,N,N-trimetil-lisina durante la síntesis.

5 En determinadas realizaciones, un extremo o ambos extremos (es decir, el extremo N-terminal y/o C-terminal) del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina se encuentran bloqueados de manera que impiden que el extremo/extremos participen en la reacción química de conjugación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza una reacción química de conjugación en la que participa por lo menos un extremo en la reacción de conjugación en caso de no encontrarse bloqueado. Se conoce de la técnica una diversidad de métodos de bloqueo de los extremos N- y/o C-terminales, incluyendo, aunque sin limitación, la modificación covalente mediante la adición de grupos alquilo (por ejemplo la metilación) en las aminas.

15 Son conocidos de la técnica métodos de síntesis de polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina tales como los descritos en la presente memoria. En algunos métodos de síntesis peptídica, se une un grupo amino de un aminoácido (o derivado de aminoácido) a un grupo carboxilo de otro aminoácido (o derivado de aminoácido) que ha sido activado mediante la reacción del mismo con un reactivo, tal como diciclohexilcarbodiimida (DCC). En el caso de que el grupo amino libre ataque el grupo carboxilo activado, se forma un enlace peptídico y se libera diciclohexilurea. En dichos métodos, pueden bloquearse ("protegerse") otros grupos potencialmente reactivos (tal como el grupo α -amino del aminoácido o derivado de aminoácido N-terminal y el grupo carboxilo del aminoácido o derivado de aminoácido C-terminal) de la participación en la reacción química. De esta manera, únicamente reaccionan grupos activos particulares de manera que se forma el producto deseado. Entre los grupos de bloqueo útiles para este fin se incluyen, aunque sin limitación, grupos terc-butoxicarbonilo (t-Boc) y grupos benzoiloxicarbonilo para proteger los grupos amina, y ésteres simples (tales como grupos metilo y etilo) y ésteres de bencilo para proteger los grupos carboxilo. Los grupos de bloqueo típicamente pueden eliminarse después con un tratamiento que deja intactos enlaces peptídicos (por ejemplo el tratamiento con ácido diluido). Este procedimiento de protección de grupos reactivos que no deberían reaccionar, acoplamiento para formar un enlace peptídico y desprotección de grupos reactivos puede repetirse. Puede sintetizarse un péptido mediante la adición secuencial de aminoácidos a una cadena peptídica en crecimiento. Los métodos de síntesis peptídica tanto en fase líquida como en fase sólida resultan adecuados para la utilización según la invención. En los métodos de síntesis peptídica en fase sólida, la cadena peptídica en crecimiento típicamente se une a una matriz insoluble (tal como, por ejemplo, perlas de poliestireno) mediante la unión del aminoácido carboxi-terminal a la matriz. Al final de la síntesis, el péptido puede liberarse de la matriz utilizando un agente de corte que no dañe los enlaces peptídicos, tal como el ácido hidrofúrico (HF). También pueden eliminarse típicamente los grupos protectores en este momento. También pueden utilizarse métodos de síntesis peptídica automatizados, de alto rendimiento y/o paralelos, según la invención. Para más información sobre los métodos de síntesis peptídica, ver, por ejemplo, Merrifield, "Solid-phase peptide synthesis", *Adv Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 32:221-96, 1969; Fridkin et al. *Annu Rev Biochem.*, 43 (0):419-43, 1974 ; Merrifield, "Concept and Early Development of Solid Phase Peptide Synthesis", *Methods in Enzymology*, 289:3-13, 1997; Sabatino et al. "Advances in automatic, manual and microwave-assisted solid-phase peptide synthesis", *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 11(6):762-70, 2009.

40 En algunas realizaciones, se utilizan modificaciones de los residuos de lisina en combinación con otros medios tal como se indica en la presente memoria (por ejemplo la sustitución de un residuo de lisina por otro aminoácido o derivado de aminoácido y/o la falta de un residuo de lisina en donde normalmente se encuentra uno en la clorotoxina).

45 En algunas realizaciones, el grupo protector en el extremo N-terminal no es eliminado al final de la síntesis. Dejar el grupo protector puede servir, por ejemplo, para generar un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina con un extremo N-terminal bloqueado, limitando de esta manera los sitios disponibles para la conjugación en un esquema de conjugación química particular.

50 II Conjugados de clorotoxina

El segundo y quinto aspectos de la invención proporcionan determinados conjugados de clorotoxina.

55 A. Conjugación

En algunas realizaciones, la fracción o fracciones están asociadas a polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina mediante un residuo de lisina o mediante el extremo N-terminal del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina.

60 Por ejemplo, las fracciones pueden unirse al residuo único disponible de lisina en los polipéptidos de clorotoxina monolisina.

65 En algunas realizaciones, las fracciones están asociadas al extremo N-terminal del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina. En algunas de dichas realizaciones, el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de

lisina no presenta ningún residuo de lisina disponible para la conjugación en ninguna de las posiciones “nativas” dentro de la clorotoxina (por ejemplo las posiciones correspondientes a las posiciones 15, 23 y 27).

5 El polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina está asociado covalentemente a la fracción/fracciones. Tal como apreciará el experto en la materia, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina y una o más fracciones pueden unirse directa o indirectamente (por ejemplo mediante un conector).

10 Se conoce de la técnica una diversidad de reacciones químicas de conjugación y pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. En determinadas realizaciones, la fracción/fracciones se unen al grupo amino epsilon de un residuo de lisina. En algunas realizaciones, la reacción de conjugación se basa en una reacción de NHS (N-hidroxisuccinimida)/EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida). En algunas realizaciones, la reacción química de conjugación se basa en una reacción de tiolación, es decir, utilizando un agente de tiolación, tal como el reactivo de Traut y/o el 2-iminotiolano.

15 En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina y una o más fracciones se unen directamente, de manera covalente, entre sí. Dicha unión covalente directa puede conseguirse de una diversidad de maneras, por ejemplo mediante enlaces amida, éster, carbono-carbono, disulfuro, carbamato, éter, tioéter, urea, amina o carbonato. Dicha unión covalente puede conseguirse, por ejemplo, aprovechando los grupos funcionales presentes en la fracción/fracciones y/o en el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina.
20 Entre los grupos funcionales adecuados que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitación, aminas, anhídridos, grupos hidroxilo, grupos carboxilo, tioles y similares. En determinadas realizaciones, se activa un grupo funcional de una parte del futuro conjugado para el acoplamiento con la otra parte del futuro conjugado. Por ejemplo, puede utilizarse un agente activador, tal como una carbodiimida, para llevar a cabo dicho acoplamiento. Se conoce de la técnica una amplia diversidad de agentes activadores y resultan adecuados para formar un conjugado proporcionado.

30 En algunas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina y una o más fracciones se unen indirectamente de modo covalente entre sí mediante un grupo conector. Dicho enlace covalente indirecto puede llevarse a cabo mediante la utilización de cualquiera de entre varios agentes bifuncionales estables bien conocidos de la técnica, incluyendo agentes homofuncionales y heterofuncionales. Ver ejemplos no limitativos de dichos agentes en, por ejemplo, el catálogo y manual de Pierce. La utilización de un agente bifuncional difiere de la utilización de un agente activador en que el primero resulta en la presencia de una fracción de unión en el conjugado resultante, mientras que en el segundo resulta en un acoplamiento directo entre las dos fracciones que participan en la reacción. Un papel del agente bifuncional podría ser el de permitir que se produzca una reacción entre dos fracciones que de otro modo serían inertes. Alternativamente o adicionalmente, el agente bifuncional, que se convierte en parte del producto de reacción, puede seleccionarse de manera que confiera cierto grado de flexibilidad conformacional al conjugado. Por ejemplo, el agente bifuncional puede comprender una cadena alquilo lineal que contiene varios átomos, por ejemplo entre 2 y 10 átomos de carbono. Alternativamente o adicionalmente, el agente bifuncional puede seleccionarse de manera que el enlace formado entre el polipéptido clorotoxina de contenido
40 reducido de lisina y la entidad/entidades o fracción/fracciones sea cortable, por ejemplo hidrolizable. (Ver ejemplos no limitativos de dichos conectores en, por ejemplo, las patentes US nº 5.773.001, nº 5.739.116 y nº 5.877.296). Dichos conectores pueden utilizarse, por ejemplo, en el caso de que la entidad o fracción que se conjuga con el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina sea una fracción terapéutica que se observe que presenta una actividad más elevada tras la hidrólisis del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina. Entre los mecanismos ejemplares para llevar a cabo el corte se incluyen la hidrólisis en el pH ácido de los lisosomas (hidrazonas, acetales y amidas de tipo cis-aconitato), el corte peptídico con enzimas lisosómicos (por ejemplo catepsinas y otros enzimas lisosómicos) y la reducción de los disulfuros. Entre los mecanismos de corte adicionales se incluyen la hidrólisis a pH fisiológico extra- o intra-celularmente. Este mecanismo puede aplicarse en el caso de que el entrecruzante utilizado para acoplar la entidad/entidades o fracción/fracciones con el polipéptido clorotoxina
50 de contenido reducido de lisina sea una entidad biodegradable/bioerosionable, tal como polidextrano y similares.

Por ejemplo, para conjugados que comprenden una o más fracciones terapéuticas, pueden prepararse conjugados que contienen hidrazona con grupos carbonilo introducidos que proporcionan las propiedades de liberación farmacológica deseadas. También pueden prepararse conjugados con un conector que comprende una cadena alquilo con un grupo disulfuro en un extremo y un derivado hidrazina en el otro extremo.

60 Los conectores que contienen grupos funcionales diferentes de las hidrazonas también presentan el potencial de ser cortados en el medio ácido de los lisosomas. Por ejemplo, pueden prepararse conjugados a partir de conectores reactivos con tiol que contienen un grupo diferente de una hidrazona que es cortable intracelularmente, tal como ésteres, amidas y acetales/cetales. También pueden utilizarse cetales construidos a partir de una cetona anular de 5 a 7 elementos que presenta uno de los átomos de oxígeno unido a la entidad o fracción y el otro a un conector para la unión a un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina.

65 Un ejemplo adicional de conectores sensibles a clase de pH son los cis-aconitados, los cuales presentan un grupo ácido carboxílico contiguo a un grupo amida. El ácido carboxílico acelera la hidrólisis de las amidas en los lisosomas

ácidos. También pueden utilizarse conectores que consiguen un tipo similar de aceleración de la velocidad de hidrólisis con otros tipos diferentes de estructuras.

5 También puede utilizarse la hidrólisis enzimática de péptidos por enzimas lisosómicos para liberar entidades o fracciones de los conjugados. Por ejemplo, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina puede unirse mediante un enlace amida a alcohol para-aminobencílico y después puede construirse un carbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y la entidad o fracción. El corte del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina conduce al colapso del carbamato o carbonato de aminobencilo y a la liberación de la entidad o fracción. A título de ejemplo adicional, puede cortarse un fenol mediante el colapso del conector en lugar del carbamato. A título de todavía otro ejemplo, se utiliza la reacción del disulfuro para iniciar el colapso de un carbamato o carbonato de para-mercaptobencilo.

15 Muchas fracciones terapéuticas, en particular agentes anticáncer, presentan una solubilidad baja o nula en agua, lo que limita la carga de fármaco en un conjugado debido a la agregación de la fracción terapéutica. Un enfoque para superar lo anterior es añadir grupos solubilizadores a los conjugados de conector construidos con un conector que consiste de PEG (polietilenglicol) y puede utilizarse un dipéptido, incluyendo, por ejemplo, los que presentan un PEG, diácido, tiol-ácido o maleimida-ácido unido al conjugado de clorotoxina de contenido reducido de lisina, un espaciador dipéptido y una amida unida a la entidad o fracción. Los enfoques que incorporan grupos PEG pueden resultar beneficiosos para superar la agregación y los límites de carga de fármaco.

20 En realizaciones en las que la fracción dentro de un conjugado de clorotoxina es una proteína, polipéptido o péptido, el conjugado de clorotoxina puede ser una proteína de fusión. Una proteína de fusión es una molécula que comprende dos o más proteínas, polipéptidos o péptidos unidos mediante un enlace covalente mediante sus esqueletos peptídicos individuales. Las proteínas de fusión utilizadas en métodos de la presente invención pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido de la técnica. Por ejemplo, pueden producirse mediante métodos sintéticos de proteínas directos utilizando un sintetizador de polipéptidos. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a extremos protuberantes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y re-amplificarse para generar una secuencia génica quimérica. Pueden obtenerse proteínas de fusión mediante métodos recombinantes estándares (ver, por ejemplo, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, N.Y., 1989).

25 Estos métodos comprenden generalmente: (1) la construcción de una molécula de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión deseada, (2) la inserción de la molécula de ácidos nucleicos en un vector de expresión recombinante, (3) la transformación de una célula huésped adecuada con el vector de expresión, y (4) la expresión de la proteína de fusión en la célula huésped. Las proteínas de fusión producidas mediante dichos métodos pueden recuperarse y aislarse directamente a partir del medio de cultivo o mediante lisis de las células, tal como es conocido de la técnica. Son bien conocidos de la técnica muchos métodos de purificación de las proteínas producidas por las células huésped transformadas. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, la precipitación, la centrifugación, la filtración en gel y la cromatografía de columna (por ejemplo de intercambio iónico, de fase inversa y de afinidad). Se han descrito otros métodos de purificación (ver, por ejemplo, Deutscher et al., "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology, vol. 192, Academic Press, 1990).

40 En determinadas realizaciones, el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina está asociado no covalentemente a la fracción/fracciones. Entre los ejemplos de asociaciones no covalentes se incluyen, aunque sin limitación, las interacciones hidrofóbicas, las interacciones electrostáticas, las interacciones de dipolo, las interacciones de van der Waals y los enlaces de hidrógeno.

45 Con independencia de la naturaleza de la asociación entre la fracción toxina y el agente terapéutico, la asociación típicamente es selectiva, específica y suficientemente fuerte para que el conjugado no se disocie antes o durante el transporte a las células y hasta el interior de las mismas. La asociación entre un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina y una o más fracciones puede llevarse a cabo utilizando cualquier acoplamiento químico, bioquímico, enzimático o genético conocido por el experto en la materia.

50 Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, un conjugado de la presente invención puede comprender cualquier número de polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina y cualquier número de fracciones, asociados entre sí mediante cualquier número de maneras diferentes. El diseño de un conjugado se ve influido por su propósito o propósitos pretendidos y las propiedades que resultan deseables en el contexto particular de su utilización. La selección de un método para asociar o unir un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina a una fracción para formar un conjugado se encuentra comprendida dentro de los conocimientos del experto en la materia y generalmente dependerá de la naturaleza de la asociación deseada (es decir, covalente vs. no covalente y/o cortable vs. no cortable), la naturaleza del polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina y la entidad/fracción, la presencia y naturaleza de los grupos químicos funcionales, y similares.

B. Fracciones

Tal como se ha indicado anteriormente, en determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina comprenden una o más fracciones no clorotoxina. Puede utilizarse cualquiera de entre una diversidad de dichas fracciones.

1. Fracciones terapéuticas

En el segundo aspecto de la invención, los conjugados proporcionados comprenden una o más fracciones terapéuticas, tal como se indica posteriormente y en la publicación de patente internacional nº WO 2009/021136.

a. Agentes anti-cáncer

En algunas realizaciones, la fracción o fracciones terapéuticas comprenden un agente anticáncer. Entre los agentes anticáncer adecuados se incluyen cualquiera de entre una gran diversidad de sustancias, moléculas, compuestos, agentes o factores que resultan directa o indirectamente tóxicos o perjudiciales para las células de cáncer, incluyendo, por ejemplo, agentes citotóxicos. Los agentes anticáncer adecuados para la utilización en la práctica de la invención pueden ser sintéticos o naturales. Los agentes anticáncer pueden comprender una única molécula o un complejo de diferentes moléculas.

Los agentes anticáncer adecuados pueden pertenecer a cualquiera de entre diversas clases de compuestos, incluyendo, aunque sin limitación, moléculas pequeñas, péptidos, sacáridos, esteroides, anticuerpos, proteínas de fusión, polinucleótidos antisentido, ribozimas, los ARN interfirientes pequeños, peptidomiméticos y similares. De manera similar, pueden encontrarse agentes anticáncer adecuados entre cualquiera de entre una diversidad de clases de agentes anticáncer, incluyendo, aunque sin limitación, agentes alquilantes, fármacos antimetabolito, antibióticos antimetabólicos, agentes antitumorales alcaloides, hormonas y antihormonas, interferones, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y diversos otros agentes antitumorales.

Los agentes anticáncer particularmente adecuados son agentes que provocan efectos secundarios no deseables debido a una pobre selectividad/especificidad para las células de cáncer, agentes que experimentan una incorporación y/o retención celular pobre o nula, agentes que están asociados a resistencia farmacológica celular y agentes que no pueden formularse fácilmente para la administración en pacientes de cáncer debido a su pobre solubilidad en agua, agregación y similares.

Se describen en mayor detalle a continuación ejemplos de agentes anticáncer adecuados que pueden utilizarse en conjugados de la presente invención.

Fármacos anticáncer pobremente solubles en agua

En determinadas realizaciones, un agente anticáncer dentro de un conjugado de la invención es un compuesto de solubilidad pobre en agua. Tal como reconocerá el experto en la materia, una amplia diversidad de agentes anticáncer pobremente solubles en agua resultan adecuados para la utilización en la presente invención.

Por ejemplo, puede seleccionarse un agente anticáncer de entre los taxanos, los cuales han sido reconocidos como agentes eficaces en el tratamiento de muchos tumores sólidos que son refractarios a otros agentes antineoplásicos. Dos taxanos actualmente autorizados son el paclitaxel (TAXOL™) y el docetaxel (TAXOTERE™). El paclitaxel, el docetaxel y otros taxanos actúan potenciando la polimerización de la tubulina, una proteína esencial en la formación de los microtúbulos del huso. La polimerización de la tubulina resulta en la formación de túbulos no funcionales muy estables, que inhiben la replicación celular y conducen a la muerte celular.

El paclitaxel es muy pobremente soluble en agua y, por lo tanto, no puede formularse en la práctica con agua para la administración intravenosa. Se han desarrollado algunas formulaciones de taxol™ para la inyección o infusión intravenosa utilizando CREMOPHOR EL™ (aceite de ricino polioxietilado) como portador farmacológico. Sin embargo, el CREMOPHOR EL™ por sí mismo es tóxico y se considera que es responsable, por lo menos en parte, de las reacciones de hipersensibilidad (erupciones severas en la piel, urticaria, rubefacción, disnea, taquicardia y otros) asociadas a la administración de dichas preparaciones. Para evitar dichos efectos secundarios, con frecuencia se prescribe premedicación conjuntamente con las formulaciones de paclitaxel que contienen CREMOPHOR EL™. El docetaxel, que es un análogo del paclitaxel, es como el paclitaxel pobremente soluble en agua. El solvente actualmente más preferente utilizado para disolver el docetaxel para uso farmacéutico es el polisorbato 80 (TWEEN 80). Además de provocar reacciones de hipersensibilidad en los pacientes, TWEEN 80 no puede utilizarse con aparatos de administración de PVC debido a su tendencia a lixiviar ftalato de dietilhexilo, que es altamente tóxico.

Un conjugado según la presente invención que comprende un taxano y polipéptido clorotoxina puede utilizarse como método mejorado de administración que evita la utilización de solventes y portadores que inducen reacciones adversas en el paciente.

En algunas realizaciones, un agente anticáncer dentro de un conjugado de clorotoxina puede pertenecer a la familia de enediina de antibióticos. Como familia, los antibióticos enediina son agentes antitumorales particularmente potentes. Algunos miembros son 1.000 veces más potentes que la adriamicina, uno de los antibióticos antitumorales utilizados clínicamente más eficaces (Y.S. Zhen et al., J. Antibiot. 42:1294-1298, 1989). Por ejemplo, un agente anticáncer en un conjugado de la invención puede ser un miembro de la familia enediina de caliqueamicinas. Originalmente aislado a partir de caldo extracto del microorganismo del suelo *Micromonospora echinospora* spp. calichensis, las caliqueamicinas fueron detectados en un cribado para agentes dañinos para el ADN potentes (M.D. Lee et al., J. Am. Chem. Soc. 109:3464-3466, 1987; M.D. Lee et al., J. Am. Chem. Soc. 109:3466-3468, 1987; W.M. Maiese et al., J. Antibiot. 42:558-563, 1989; M.D. Lee et al., J. Antibiot. 42:1070-1087, 1989).

Las caliqueamicinas se caracterizan por una estructura nuclear trisulfuro alílico de enediina bicíclica rígida compleja unida mediante enlaces glucosilo a una cadena oligosacárida. La parte oligosacárido contiene varios derivados de azúcar sustituidos y un anillo tetrahidropirano sustituido. El núcleo (o aglicona) que contiene enediina y las partes carbohidrato de las caliqueamicinas se ha informado que llevan a cabo funciones diferentes en la actividad biológica de dichas moléculas. Se cree generalmente que la parte nuclear corta el ADN, mientras que la parte oligosacárido de las caliqueamicinas sirve como sistema de reconocimiento y transporte y guía el fármaco a un surco menor de ADN de doble cadena en el que el fármaco se ancla ("Enedinyne Antibiotics as Antitumor Agents", Doyle and Borders, 1995, Marcel-Dekker: New York;). El corte del ADN de doble cadena es un tipo de daño que habitualmente es no reparable o no fácilmente reparable para la célula y muy frecuentemente resulta letal.

Debido a sus propiedades químicas y biológicas, se han sometido a ensayo varios análogos de las caliqueamicinas en modelos preclínicos como potenciales agentes antitumorales. Su desarrollo como terapias de agente único no se ha buscado debido a las toxicidades retrasadas que limitan el intervalo de dosis terapéutica para el tratamiento. Sin embargo, su potencia los hace particularmente útiles para la quimioterapia dirigida.

Entre otros ejemplos de agentes anticáncer pobremente solubles en agua adecuados se incluyen el tamoxifeno y BCNU. El tamoxifeno ha sido utilizado con diversos grados de éxito para tratar una diversidad de carcinomas positivos para receptores de estrógeno, tales como el cáncer de mama, el carcinoma de endometrio, el carcinoma de próstata, el carcinoma ovárico, el carcinoma renal, el melanoma, los tumores colorrectales, los tumores desmoides, el carcinoma pancreático y los tumores pituitarios. Además de encontrarse limitada por su pobre solubilidad en agua, la quimioterapia con tamoxifeno puede provocar efectos secundarios tales como la resistencia farmacológica celular. BCNU (1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea) es bien conocido por sus propiedades antitumorales y desde 1972 ha sido autorizado por el National Cancer Institute para la utilización contra tumores cerebrales, cáncer de colon, enfermedad de Hodgkin, cáncer de pulmón y mieloma múltiple. Sin embargo, la utilización eficiente de dicho fármaco anticáncer también se encuentra comprometida por su baja solubilidad.

Agentes anti-cáncer asociados a la resistencia a fármacos

En determinadas realizaciones de la presente invención, los conjugados de clorotoxina comprenden un agente anticáncer asociado a la resistencia a fármaco. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente anticáncer asociado a la resistencia a fármaco" se refiere a cualquier quimioterapéutico al que las células de cáncer son resistentes o pueden volverse resistentes. Tal como se ha indicado anteriormente, la resistencia a un agente anticáncer puede deberse a muchos factores y puede operar mediante mecanismos diferentes. La administración de un conjugado de la presente invención que comprende un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina y un agente anticáncer asociado a la resistencia a fármaco puede potenciar la incorporación celular del agente anticáncer y llevarlo al interior de las células tumorales, por ejemplo las células tumorales resistentes.

Cualquiera de entre una amplia diversidad de agentes anticáncer asociados a resistencia a fármaco resulta adecuado para la utilización en la presente invención. Por ejemplo, el agente anticáncer asociado a la resistencia a fármaco puede ser el metotrexato. El metotrexato, un fármaco del cáncer utilizado ampliamente, es un análogo del ácido fólico y bloquea etapas importantes de la síntesis del ácido tetrahidrofólico, que es él mismo una fuente crucial de compuestos utilizados en la síntesis del timidilato, un bloque constructivo que es específico y, por lo tanto, especialmente crítico para la síntesis del ADN. La resistencia a fármaco inducida por el metotrexato está ligada a una deficiencia en la incorporación celular de ese fármaco.

Entre otros ejemplos de agentes anticáncer adecuados se incluyen los análogos de purina y pirimidina que están asociados a resistencia a fármaco debido a una activación intracelular inadecuada del fármaco a través de la pérdida de actividad enzimática. Un ejemplo de dicho análogo de purina es la 6-mercaptopurina (6-MP). Una causa común de resistencia de las células tumorales al 6-MP es la pérdida del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), que activa el 6-MP en su nucleótido correspondiente 6-mercaptoposforibosilpurina (6-MPRP), la forma letal del fármaco. Sin respaldo teórico, se plantea que la resistencia podría superarse en el caso de que el 6-MPRP mismo pudiese introducirse en la célula. Aunque este compuesto se encuentra disponible comercialmente, todavía no ha sido utilizado terapéuticamente en el tratamiento del cáncer debido a que no resulta adecuadamente transportado al interior de las células vivas. La asociación de 6-MRPP a un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina según la presente invención incrementaría drásticamente su capacidad de cruzar la membrana

celular. La tioguanina es otro ejemplo de agente anticáncer que está asociado a la resistencia a fármaco debido a la falta del enzima HGPRT.

5 Entre los ejemplos de análogos de pirimidina que están asociado a la resistencia a fármaco debido a una inadecuada activación intracelular se incluyen la citosina arabinósido y la adenosina arabinósido, los cuales resultan activados por el enzima desoxicitidina quinasa (DOCK) en las formas letales citosina difosfato y adenosina difosfato, respectivamente. Un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina puede acoplarse con la forma activada de dichos análogos de pirimidina para potenciar su incorporación celular y superar la resistencia celular a fármaco.

10 Entre otros ejemplos de agentes anticáncer asociados a la resistencia a fármaco se incluyen, aunque sin limitación, 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, citosina, arabinósido, vinblastina, vincristina, daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina y bleomicina.

Otros agentes anticáncer

15 En algunas realizaciones, se selecciona un agente anticáncer de entre el grupo que consiste de fármacos alquilantes (por ejemplo mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán e ifosfamida), antimetabolitos (por ejemplo metotrexato), antagonistas de purina y antagonistas de pirimidina (por ejemplo 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, citarabina y gemcitabina), venenos del hueso (por ejemplo vinblastina, vincristina, vinorelbina y paclitaxel), podofilotoxinas (por ejemplo etopósido, irinotecán y topotecán), antibióticos (por ejemplo doxorubicina, bleomicina y mitomicina), nitrosoureas (por ejemplo carmustina y lomustina), iones inorgánicos (por ejemplo cisplatino y carboplatino), enzimas (por ejemplo asparaginasa) y hormonas (por ejemplo tamoxifeno, leuprolído, flutamida y megestrol), entre otros. Para un comentario más exhaustivo sobre las terapias del cáncer actualmente, ver el sitio de Internet con dirección "http://" seguida inmediatamente por "www.cancer.gov/", una lista de fármacos oncológicos autorizados por la FDA en el sitio de Internet con dirección "http://" seguida inmediatamente por "www.fda.gov/cder/cancer/druglistframe.htm" y The Merck Manual, edición decimoséptima, 1999.

Agentes ácidos nucleicos

30 En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina comprenden un agente ácido nucleico.

Se ha demostrado que numerosos cánceres y tumores están asociados a diversos grados de alteración genética, tales como las mutaciones puntuales, las deleciones génicas y las duplicaciones. Muchas nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer, tales como las que han sido denominadas "antisentido", "antigén" e "interferencia de ARN" han sido desarrollado para modular la expresión de los genes (A. Kalota et al., Cancer Biol. Ther. 3: 4-12; , 2004; Y. Nakata et al., Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 15: 163-182, 2005; V. Wachek y U. Zangmeister-Wittke, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 59: 65-73, 2006; A. Kolata et al., Handb. Exp. Pharmacol. 173: 173-196, 2006). Estos enfoques utilizan, por ejemplo, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, agentes tríplex o ARN interfirientes cortos (ARNic) para bloquear la transcripción o la traducción de un ARNm o ADN específico de un gen diana, mediante el enmascaramiento de dicho ARNm con un ácido nucleico o ADN antisentido con un agente tríplex, mediante el corte de la secuencia de nucleótidos con un ribozima o mediante la destrucción del ARNm mediante un complejo mecanismo que participa en la interferencia del ARN. En muchas de dichas estrategias, se utilizan principalmente oligonucleótidos como agentes activos, aunque también se han aplicado moléculas pequeñas y otras estructuras.

45 Aunque las estrategias basadas en oligonucleótidos para la modulación de la expresión génica presentan un enorme potencial para el tratamiento de algunos cánceres, las aplicaciones farmacológicas de los oligonucleótidos se han visto dificultadas principalmente por un transporte ineficaz de dichos compuestos a sus sitios de acción dentro de las células de cáncer. (P. Herdewijn et al., Antisense Nucleic Acids Drug Dev. 10:297-310, 2000; ; Y. Shoji y H. Nakashima, Curr. Charm. Des. 10: 785-796, 2004; A.W Tong et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 7: 114-124, 2004).

50 En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina proporcionados comprenden un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina y una molécula de ácidos nucleicos que resulta útil como agente terapéutico (por ejemplo anticáncer). Una diversidad de tipos químicos y formas estructurales de los ácidos nucleicos pueden resultar adecuados para dichas estrategias. Entre ellas se incluyen, a título de ejemplo no limitativo, ADN, incluyendo el de cadena sencilla (ADNcs) y el de doble cadena (ADNdc); ARN, incluyendo, aunque sin limitación, ARNcs, ARNdc, ARNt, ARNm, ARNr, ARN enzimático, híbridos ARN:ADN, ADN triplexado (por ejemplo ADNdc en asociación con un oligonucleótido corto) y similares.

60 En algunas realizaciones, el agente ácido nucleico presenta una longitud de entre aproximadamente 5 y 2.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, el agente ácido nucleico presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, el agente ácido nucleico presenta una longitud inferior a aproximadamente 2000, 1900, 1800, 1700, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 o menos nucleótidos.

65

En algunas realizaciones, el agente ácido nucleico comprende un promotor y/o otras secuencias que regulan la transcripción. En algunas realizaciones, el agente ácido nucleico comprende un origen de replicación y/o otras secuencias que regulan la replicación. En algunas realizaciones, el agente ácido nucleico no incluye un promotor y/o un origen de replicación.

5 Entre los agentes anticáncer ácidos nucleicos adecuados para la utilización en la práctica de la presente invención se incluyen aquellos agentes con diana en genes asociados a la tumorigénesis y el crecimiento celular o la transformación celular (por ejemplo protooncogenes, los cuales codifican proteínas que estimulan la división celular), genes angiogénicos/antiangiogénicos, genes supresores tumorales (que codifican proteínas que suprimen la división celular), genes codificantes de proteínas asociadas al crecimiento tumoral y/o la migración tumoral, y genes suicidas (que inducen la apoptosis u otras formas de muerte celular), especialmente genes suicidas que son más activas en las células en división rápida.

15 Entre los ejemplos de genes asociados a la tumorigénesis y/o la transformación celular se incluyen los genes de fusión MLL, BCR-ABL, TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3- FKHR, Bc1-2, AML1-ETO, AML1-MTG8, Ras, Fos PDGF, RET, APC, NF-1, Rb, p53, MDM2 y similares; genes sobreexpresados, tales como genes de resistencia multifármaco, ciclinas, beta-catenina, genes de telomerasa, c-myc, n-myc, Bc1-2, Erb-B1 y Erb-B2, y genes mutados, tales como Ras, Mos, Raf, y Met Entre los ejemplos de genes supresores tumorales se incluyen, aunque sin limitación, p53, p21, RB1, WT1, NF1, VHL, APC, DAP quinasa, p16, ARF, neurofibromina y PTEN Entre los ejemplos de genes que pueden ser dianas de agentes ácidos nucleicos útiles en la terapia anticáncer se incluyen genes codificantes de proteínas asociadas a la migración tumoral, tales como integrinas, selectinas y metaloproteinasas; genes antiangiogénicos codificantes de proteínas que estimulan la formación de nuevos vasos, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) o FCVEr; genes antiangiogénicos codificantes de proteínas que inhiben la neovascularización, tales como endostatina, angiostatina y FCVE-R2, y genes codificantes de proteínas, tales como interleuquinas, interferón, factor de crecimiento fibroblástico (α -FCF y β -FCF), factor de crecimiento similar a la insulina (por ejemplo, FCI-1 y FCI-2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de necrosis tumoral (FNT), factor de crecimiento transformante (por ejemplo FCT- α y FCT- β), factor de crecimiento epidérmico (FCE), factor de crecimiento de queratinocitos (FCQ), factor de células madre y su ligando de receptor c-Kit (FCM/c-Kit), CD40L/CD40, VLA-4 VCAM-1, ICAM-1/LFA-1, hialurina/CD44 y similares. Tal como reconocerá el experto en la materia, los ejemplos anteriormente proporcionados no son exclusivos.

Los agentes ácidos nucleicos adecuados para la utilización en la invención pueden presentar cualquiera de entre una diversidad de usos, incluyendo, por ejemplo, la utilización como agentes anticáncer u otros agentes terapéuticos, sondas, cebadores, etc. Los agentes ácidos nucleicos pueden presentar actividad enzimática (por ejemplo actividad de ribozima), actividad inhibidora de la expresión génica (por ejemplo como agentes antisentido o ARNic, etc.) y/o otras actividades. Los agentes ácidos nucleicos pueden ser activos ellos mismos o pueden ser vectores que transportan agentes ácidos nucleicos activos (por ejemplo mediante replicación y/o transcripción de un ácido nucleico transportado). Para los fines de la presente memoria, dichos ácidos nucleicos de vector se consideran "agentes terapéuticos" en el caso de que codifiquen o de otro modo transporten un agente terapéuticamente activo, aunque ellos por sí mismos no presenten actividad terapéutica.

En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina comprenden un agente terapéutico ácido nucleico que comprende o codifica un compuesto antisentido. Las expresiones "compuesto o agente antisentido", "oligómero antisentido", "oligonucleótido antisentido" y "análogo de oligonucleótido antisentido" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria y se refieren a una secuencia de bases nucleótidas y a un esqueleto subunidad-a-subunidad que permite que el compuesto antisentido se hibride con una secuencia diana en un ARN mediante apareamiento de bases de Watson-Crick para formar un oligómero heterodúplex de ARN dentro de la secuencia diana. El oligómero puede presentar una complementariedad de secuencias exacta o prácticamente exacta dentro de la secuencia diana. Dichos oligómeros antisentido pueden bloquear o inhibir la traducción del ARNm que contiene la secuencia diana o inhibir la transcripción génica. Los oligómeros antisentido pueden unirse a secuencias de doble cadena o de cadena sencilla.

Entre los ejemplos de oligonucleótidos antisentido adecuados para la utilización en la práctica de la presente invención se incluyen, por ejemplo, los mencionados en las revisiones siguientes: R.A Stahel et al., Lung Cancer 41: S81-S88, 2003; K.F. Pirolo et al., Pharmacol. Ther. 99: 55-77, 2003; A.C. Stephens y R.P. Rivers, Curr. Opin. Mol. Ther. 5: 118- 122, 2003; N.M. Dean y C.F. Bennett, Oncogene 22: 9087-9096, 2003; N. Schiavone et al., Curr. Pharm. Des. 10: 769-784, 2003; L. Vidal et al., Eur. J. Cancer 41: 2812- 2818, 2005; T. Aboul-Fadl, Curr. Med. Chem. 12: 2193-2214, 2005; M.E. Gleave y B.P. Monia, Nat. Rev. Cancer 5: 468-479, 2005; Y.S. Cho-Chung, Curr. Pharm. Des. 11: 2811-2823, 2005; E. Rayburn et al., Lett. Drug Design & Discov. 2: 1-18, 2005; E.R. Rayburn et al., Expert Opin. Emerg. Drugs 11: 337-352, 2006; I. Tamm y M. Wagner, Mol. Biotechnol. 33:221-238, 2006.

Entre los ejemplos de oligonucleótidos antisentido adecuados se incluyen, por ejemplo, oblimersen sodio (también conocido como GensenseTM o G31239, desarrollado por Genta, Inc., Berkeley Heights, NJ), un oligómero fosforotioato con diana en la región del codón de inicio del ARNm bc1-2. Bc1-2 es un potente inhibidor de la apoptosis y se sobreexpresa en muchos cánceres, entre ellos los linfomas foliculares, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer de próstata y los linfomas de grado intermedio/alto (C.A. Stein et al., Semin. Oncol. 32: 563-573,

2005; S.R. Frankel, *Semin. Oncol.* 30: 300-304, 2003). Entre otros oligonucleótidos antisentido adecuados se incluyen GEM-231 (HYB0165, Hybridon, Inc., Cambridge, MA), que es un oligonucleótido de esqueleto mixto dirigido contra la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc (S. Goel et al., *Clin. Cancer Res.* 203, 9: 4069-4076); Affinitak (ISIS 3521 o aprinocarsen, ISIS Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA), un inhibidor antisentido de PKC α ; OGX-011 (Isis 112989, Isis Pharmaceuticals, Inc.), un oligonucleótido antisentido modificado con 2'-metoxietilo contra la clusterina, una glucoproteína implicada en la regulación del ciclo celular, el remodelado de los tejidos, el transporte de lípidos y la muerte celular y que se sobreexpresa en los cánceres de mama, próstata y colon; ISIS 5132 (Isis 112989, Isis Pharmaceuticals, Inc.), un oligonucleótido fosforotioato complementario a la secuencia de la región 3' no traducida del ARNm de c-raf-1 (S.P. Henry et al., *Anticancer Drug Des.* 12: 409-420; , 1997; B.P. Monia et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15481- 15484, 1996; C.M. Rudin et al., *Clin. Cancer Res.* 7: 1214-1220, 2001); ISIS 2503 (Isis Pharmaceuticals, Inc.), un inhibidor antisentido de oligonucleótido fosforotioato de la expresión del ARNm de H-ras humano (J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* 270: 1628-1644, 2003); oligonucleótidos con diana en el inhibidor ligado a X de la proteína de apoptosis (XIAP), que bloquea una parte sustancial de la ruta de la apoptosis, tal como GEM 640 (AEG 35156, Aegera Therapeutics Inc. e Hybridon, Inc.) o con diana en la survivina, un inhibidor de la proteína de apoptosis (IPA), tal como ISIS 23722 (Isis Pharmaceuticals, Inc.), un oligonucleótido quimérico 2'-O-metoxietilo; MG98, con diana en la ADN metil transferasa, y GTI-2040 (Lorus Therapeutics, Inc. Toronto, Canadá), un oligonucleótido 20-mero que es complementario a la región codificante en el ARNm del componente subunidad pequeña R2 de la ribonucleótido reductasa humana.

Entre otros oligonucleótidos antisentido adecuados se incluyen oligonucleótidos antisentido que están siendo desarrollados contra Her-2/neu, c-Myb, c-Myc, and c-Raf (ver, por ejemplo, A. Biroccio et al., *Oncogene* 22: 6579-6588, 2003; Y. Lee et al., *Cancer Res.* 63: 2802-2811, 2003; B. Lu et al., *Cancer Res.*, 64: 2840-2845, 2004; K.F. Pirolo et al., *Pharmacol. Ther.* 99: 55-77, 2003, y A. Rait et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1002: 78-89, 2003).

En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina de la presente invención comprenden un agente anticáncer de ácidos nucleicos que comprende o codifica una molécula de ARN interfiriente. Las expresiones "ARN interfiriente" y "molécula de ARN interfiriente" se utilizan en la presente memoria intercambiamente y se refieren a una molécula de ARN que puede inhibir o regular negativamente la expresión génica o silenciar un gen de una manera específica de secuencia, por ejemplo mediando en la interferencia de ARN (ARNi). La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo específico de secuencia evolutivamente conservado que resulta inducido por el ARN de doble cadena (ARNdc) que induce la degradación del ARNm de cadena sencilla diana complementario y el "silenciamiento" de las secuencias traducidas correspondientes (McManus y Sharp, *Nature Rev. Genet.* 3: 737, 2002). El ARNi funciona mediante el corte enzimático de cadenas de ARNdc más largas en secuencias biológicamente activas de "ARN interfiriente corto" (ARNic) de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud (Elbashir et al., *Genes Dev.* 15: 188, 2001). La interferencia de ARN ha emergido como un enfoque prometedor para la terapia del cáncer.

Un ARN interfiriente adecuado para la utilización en la práctica de la presente invención puede proporcionarse en varias formas. Por ejemplo, puede proporcionarse un ARN interfiriente como uno o más de entre ARN interfiriente corto (ARNic) aislado, ARN de doble cadena (ARNdc), micro-ARN (ARNmi) o ARN horquilla corto (ARNhc).

Entre los ejemplos de moléculas de ARN interfiriente adecuadas para la utilización en la presente invención se incluyen, por ejemplo, los ARNi citados en las revisiones siguientes: O. Milhavet et al., *Pharmacol. Rev.* 55: 629-648, 2003; F. Bi et al., *Curr. Gene. Ther.* 3: 411- 417, 2003; P.Y. Lu et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5: 225-234, 2003; I. Friedrich et al., *Semin. Cancer Biol.* 14: 223-230, 2004; M. Izquierdo, *Cancer Gene Ther.* 12: 217-227, 2005; P.Y. Lu et al., *Adv. Genet.* 54: 117-142, 2005; G.R. Devi, *Cancer Gene Ther.* 13: 819-829, 2006; M.A. Behlke, *Mol. Ther.* 13: 644-670, 2006, y L.N. Putral et al., *Drug News Perspect.* 19: 317-324, 2006.

Entre otros ejemplos de moléculas de ARN interfiriente adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, ARN interfirientes de p53 (por ejemplo, T.R. Brummelkamp et al., *Science* 296: 550-553, 2002; M.T. Hemman et al., *Nat. Genet.* 33: 396-400, 2003); ARN interfirientes con diana en la fusión ber-abl, que está asociada al desarrollo de la leucemia mieloide crónica y la leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, M. Scherr et al., *Blood* 101: 1566-1569, 2003 M.J. Li et al., *Oligonucleotides* 13: 401-409, 2003), ARN interfirientes que inhiben la expresión de NPM-ALK, una proteína que se encuentra en el 75% de los linfomas de células grandes anaplásicos y conduce a la expresión de una quinasa constitutivamente activa asociada a la formación de tumores (U. Ritter et al., *Oligonucleotides* 13: 365-373, 2003); ARN interfirientes con diana en oncogenes, tales como Raf-1 (T.F. Lou et al., *Oligonucleotides* 13: 313- 324, 2003), K-Ras (T.R. Brummelkamp et al., *Cancer Cell* 2: 243-247, 2002), erbB-2 (G. Yang et al., *J. Biol. Chem.* 279: 4339-4345, 2004); ARN interfirientes con diana en la proteína b-catenina la expresión de la cual conduce a la transactivación de los genes diana de factor de células T, que se cree que es el suceso transformante principal en el cáncer colorrectal (M. van de Wetering et al., *EMBO Rep.* 4: 609-615, 2003).

En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina comprenden un agente terapéutico ácido nucleico que es un ribozima. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ribozima" se refiere a una molécula de ARN catalítico que puede cortar otras moléculas de ARN de una manera específica de diana. Los ribozimas pueden ser utilizados para regular negativamente la expresión de cualesquiera productos no deseables de genes de interés. Entre los ejemplos de ribozimas que pueden utilizarse en la práctica de la presente invención se incluyen, aunque

sin limitación, ANGIOZYME™ (RPI.4610, Sima Therapeutics, Boulder, CO), un ribozima con diana en la región conservada del ARNm del receptor de factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE)-1 humano, de ratón y de rata y Herzyme (Sima Therapeutics)

5 Fotosensibilizadores

En determinadas realizaciones, las fracciones dentro de los conjugados de clorotoxina comprenden un fotosensibilizador utilizado en la terapia fotodinámica (TFD). En la TFD, tras la administración local o sistémica de un fotosensibilizador en un paciente se realiza irradiación con luz que resulta absorbida por el fotosensibilizador en el tejido u órgano que debe tratarse. La absorción de luz por el fotosensibilizador genera especies reactivas (por ejemplo radicales) que resultan perjudiciales para las células. Para una eficacia máxima, un fotosensibilizador típicamente presenta una forma adecuada para la administración y también una forma que puede experimentar fácilmente la internalización celular en el sitio diana, con frecuencia con cierto grado de selectividad respecto a los tejidos normales.

Aunque algunos fotosensibilizadores (por ejemplo Photofrin®, QLT, Inc., Vancouver, BC, Canadá) se han administrado con éxito como parte de una simple solución acuosa, estas soluciones acuosas pueden no resultar adecuadas para fármacos fotosensibilizadores hidrofóbicos, tales como los que presentan una estructura a base de tetra- o poli-pirrol. Estos fármacos presentan una tendencia inherente a agregarse mediante apilamiento molecular, resultando en una reducción significativa de la eficacia de los procesos de fotosensibilización (Siggel et al., J. Phys. Chem. 100: 2070-2075, 1996). Entre los enfoques a la minimización de la agregación se incluyen formulaciones liposómicas (por ejemplo para el derivado benzoporfirina monoácido A, BPDMA, por sus siglas en inglés, Verteporfin®, QLT, Inc., Vancouver, Canadá, y la ftalocianina de cinc, CIBA-Geigy, Ltd., Basel, Suiza) y la conjugación de los fotosensibilizadores con copolímeros en bloque biocompatibles (Peterson et al., Cancer Res. 56: 3980-3985, 1996) y/o los anticuerpos (Omelyanenko et al., Int. J. Cancer 75: 600-608, 1998).

Los conjugados de clorotoxina que comprenden un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina asociado a un fotosensibilizador pueden utilizarse como nuevos sistemas de administración para la TFD. Además de reducir la agregación del fotosensibilizador, la administración de fotosensibilizadores según la presente invención muestra otras ventajas, tales como una especificidad incrementada para los tejidos/órganos diana y la internalización celular del fotosensibilizador.

Entre los fotosensibilizadores adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen cualquiera de entre una diversidad de moléculas sintéticas y naturales que presentan propiedades de fotosensibilización útiles en la TFD. En determinadas realizaciones, el espectro de absorción del fotosensibilizador se encuentra dentro del rango visible, típicamente entre 350 nm y 1.200 nm, preferentemente entre 400 nm y 900 nm, por ejemplo entre 600 nm y 900 nm. Entre los fotosensibilizadores adecuados que pueden acoplarse con toxinas según la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, porfirinas y derivados de porfirina (por ejemplo clorinas, bacterioclorinas, isobacterioclorinas, ftalocianinas y naftalocianinas), metaloporfirinas, metaloftalocianinas, angelicinas, pigmentos calcogenapirilio, clorofilas, coumarinas, flavinas y compuestos relacionados, tales como aloxazina y riboflavina, fullerenos, feofórbidos, pirofeofórbidos, cianinas (por ejemplo merocianina 540), feofitinas, safirinas, texafirinas, purpurinas, porfíricos, fenotiazinios, derivados de azul de metileno, naftalimidias, derivados de azul del Nilo, quinonas, perilenquinonas (por ejemplo hipericinas, hipocrelinas y cercosporinas), psoralenos, quinonas, retinoides, rodaminas, tiofenos, verdinas, pigmentos xanteno (por ejemplo eosinas, eritrosinas y rosa bengal), formas diméricas y oligoméricas de porfirinas y profármacos tales como el ácido 5-aminolevulínico (R.W. Redmond y J.N. Gamlin, Photochem. Photobiol. 70: 391-475, 1999).

Entre los fotosensibilizadores ejemplares adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen los indicados en las patentes US nº 5.171.741, nº 5.171.749, nº 5.173.504, nº 5.308.608, nº 5.405.957, nº 5.512.675, nº 5.726.304, nº 5.831.088, nº 5.929.105 y nº 5.880.145.

Radiosensibilizadores

En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina comprenden un radiosensibilizador. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "radiosensibilizador" se refiere a una molécula, compuesto o agente que provoca que las células tumorales sean más sensibles a la terapia de radiación. La administración de un radiosensibilizador en un paciente que recibe terapia de radiación generalmente resulta en la potenciación de los efectos de la terapia de radiación. Idealmente, un radiosensibilizador ejerce su función únicamente sobre las células diana. Para facilitar la utilización, un radiosensibilizador debería ser capaz de encontrar las células diana incluso si se administra sistémicamente. Sin embargo, los radiosensibilizadores disponibles actualmente típicamente no son selectivos para los tumores y se distribuyen mediante difusión en el cuerpo del mamífero. Los conjugados de clorotoxina de la presente invención pueden utilizarse como nuevo sistema de transporte para radiosensibilizadores.

Se conoce de la técnica una diversidad de radiosensibilizadores. Entre los ejemplos de radiosensibilizadores adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, paclitaxel (TAXOL®), carboplatino, cisplatino y oxaliplatino (Amorino et al., Radiat. Oncol. Investig. 7: 343-352, 1999; Choy, Oncology

13:22-38, 1999; Safran et al., *Cancer Invest.*, 19: 1-7, 2001; Dionet et al., *Anticancer Res.*, 22: 721-725, 2002; Cividalli et al., *Radiat. Oncol. Biol.: Phys.* 52:1092-1098, 2002); gemcitabina (Gemzar[®]) (Choy, *Oncology* 14:7-14, 2000; Mornex y Girard, *Annals of Oncology* 17:1743- 1747, 2006); etanidazol (Nitrolmidazole[®]) (Inanami et al., *Int. J. Radiat. Biol.*78:267-274, 2002); misonidazol (Tamulevicius et al., *Br. J. Radiology* 54: 318-324, 2002; Cividalli et al., *Radiat. Res.* 100:340-347, 1984), tirapazamina (Tamulevicius et al., *Br. J.* 79: 991-998, 2006; Rischin et al., *J. Clin. Oncol.* 19: 535-542, 2001; Shulman et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.: Phys.* 44: 349-353), 1999; y derivados de base de ácido nucleico, por ejemplo purinas o pirimidinas halogenadas, tales como 5-fluorodesoxiuridina (Buchholz et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.: Phys.* 32:1053-1058, 1995).

10 Radioisótopos

En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina comprenden un radioisótopo. Entre los ejemplos de radioisótopos adecuados se incluyen cualquier emisor α , β o γ que, al localizarse en un sitio tumoral, resulta en la destrucción celular (S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (editores), Academic Press, Inc., 1995. Entre los ejemplos de dichos radioisótopos se incluyen, aunque sin limitación, yodo-131 (¹³¹I), yodo-125 (¹²⁵I), bismuto-212 (²¹²Bi), bismuto-213 (²¹³Bi), astatina-211 (²¹¹At), renio-186 (¹⁸⁶Re), renio-188 (¹⁸⁸Re), fósforo-32 (³²P), itrio-90 (⁹⁰Y), samario-153 (¹⁵³Sm) y lutecio-177 (¹⁷⁷Lu).

20 Superantígenos

En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina comprenden un superantígeno o parte biológicamente activa del mismo. Los superantígenos constituyen un grupo de proteínas bacterianas y víricas que son extremadamente eficientes en la activación de un gran fracción de la población de células T. Los superantígenos se unen directamente al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sin ser procesados. De hecho, los superantígenos se unen sin procesar en el exterior del surco de unión a antígeno en las moléculas de CMH de clase II, evitando de esta manera la mayor parte del polimorfismo en el sitio de unión a péptido convencional.

Se ha desarrollado un enfoque terapéutico tumoral basado en superantígenos para el tratamiento de los tumores sólidos. En este enfoque, una fracción de direccionamiento, por ejemplo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se conjuga con un superantígeno, proporcionando un superantígeno dirigido. En el caso de que el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, reconozca un antígeno asociado a tumor, el superantígeno dirigido, unido a células tumorales, puede inducir que las células T citotóxicas activadas por superantígeno eliminen las células tumorales directamente mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de superantígeno. (ver, por ejemplo, Sogaard et al., "Antibody-targeted superantigens in cancer immunotherapy," *Immunotechnology*, 2(3): 151-162, 1996).

Los terapéuticos tumorales basados en superantígenos han tenido cierto éxito. Por ejemplo, las proteínas de fusión con enterotoxina A estafilocócica de tipo salvaje (EAE) han sido investigadas en ensayos clínicos de cáncer colorrectal y pancreático (Giantonio et al., *J. Clin. Oncol.* 15:1994-2007, 1997; Alpaugh et al., *Clin. Cancer Res.* 4: 1903-1914, 1998; Cheng et al., *J. Clin. Oncol.* 22:602-609, 2004; se han estudiado los superantígenos estafilocócicos del clúster génico de la enterotoxina (egc., por sus siglas en inglés) para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (Terman et al., *Clin. Chest Med.* 27:321-324, 2006, y se ha evaluado la enterotoxina B estafilocócica para la inmunoterapia intravesical del cáncer de vejiga superficial (Perabo et al., *Int. J. Cancer*, 2005, 115:591-598, 2004).

Un superantígeno, o una parte biológicamente activa del mismo, puede asociarse a un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina para formar un conjugado de clorotoxina según la presente invención y utilizarse en una terapia, por ejemplo en una terapia anticáncer, tal como se indica en la presente memoria.

Entre los ejemplos de superantígenos adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, enterotoxina estafilocócica (EE) (por ejemplo la enterotoxina A estafilocócica (EAE) o la enterotoxina E estafilocócica (EEE)), la exotoxina de *Streptococcus pyogenes* (ESP), la toxina del síndrome del choque tóxico de *Staphylococcus aureus* (TSCT-1), la exotoxina mitogénica estreptocócica (EME), el superantígeno estreptocócico (SAE) y los superantígenos estafilocócicos del clúster génico de la enterotoxina. Tal como es conocido de la técnica, las estructuras tridimensionales de los superantígenos anteriormente listados pueden obtenerse del Protein Data Bank. De manera similar, las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos de los superantígenos anteriormente listados y otros superantígenos pueden obtenerse de GenBank.

Enzimas activadores de profármaco

En determinadas realizaciones, puede utilizarse un conjugado de clorotoxina de la presente invención en terapia de profármaco enzimático dirigida. En un enfoque dirigido de terapia de profármaco enzimático, se administran en el sujeto un enzima dirigido/con diana y un profármaco, en el que el enzima dirigido se localiza específicamente en una parte del cuerpo del sujeto, en donde convierte el profármaco en un fármaco activo. El profármaco puede convertirse en un fármaco activo en una etapa (por el enzima dirigido) o en más de una etapa. Por ejemplo, el profármaco puede ser convertido en un precursor de un fármaco activo por el enzima dirigido. A continuación, el precursor

puede ser convertido en el fármaco activo mediante, por ejemplo, la actividad catalítica de uno o más enzimas dirigidos adicionales, uno o más enzimas no dirigidos administrados en el sujeto, uno o más enzimas presentes naturalmente en el sujeto o en el sitio diana en el sujeto (por ejemplo una proteasa, fosfatasa, quinasa o polimerasa), por un agente que se administra en el sujeto y/o mediante un procedimiento químico que no está catalizado enzimáticamente (por ejemplo oxidación, hidrólisis, isomerización, epimerización, etc.).

Se han utilizado diferentes enfoques para dirigir/transportar el enzima hasta el sitio de interés. Por ejemplo, en la terapia ADEPT (por sus siglas en inglés, terapia de profármaco enzimático dirigido por anticuerpos), un anticuerpo diseñado/desarrollado contra un antígeno tumoral se une a un enzima y se inyecta en el sujeto, resultando en la unión selectiva del enzima al tumor. En el caso de que la discriminación entre los niveles enzimáticos en el tumor y en el tejido normal sea suficiente, se administra un profármaco en el sujeto. El profármaco es convertido en su forma activa por el enzima únicamente dentro del tumor. La selectividad se consigue mediante la especificidad tumoral del anticuerpo y mediante el retardo de la administración del profármaco hasta que exista un diferencial grande entre los niveles de enzima en tumor y tejido normal. Los primeros ensayos clínicos han sido prometedores e indican que ADEPT podría convertirse en un tratamiento eficaz para todos los cánceres sólidos para los que se conocen anticuerpos asociados a tumor o específicos de tumor. Los tumores también han sido diana de genes codificantes de enzimas activadores de profármaco. Este enfoque se ha denominado terapia de profármaco enzimático dirigido por virus (VDEPT, por sus siglas en inglés), o más generalmente GDEPT (terapia de profármaco enzimático dirigido por genes) y ha demostrado buenos resultados en sistemas de laboratorio. Entre otras versiones de terapia de profármaco enzimático dirigida se incluyen PDEPT (terapia de profármaco enzimático dirigida por polímero), LEAPT (terapia de profármaco activado por enzima dirigida por lectina) y CDEPT (terapia de profármaco enzimático dirigida por clostridios). Un conjugado según la presente invención, que comprende un enzima activador de profármaco asociado a un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina, puede ser utilizado de una manera similar.

Se describen ejemplos no limitativos de combinaciones de enzima/profármaco/fármaco activo adecuadas para la utilización en la presente invención en, por ejemplo, Bagshawe et al., *Current Opinions in Immunology* 11:579-583, 1999; Wilman, "Prodrugs in Cancer Therapy", *Biochemical Society Transactions* 14:375-381, 615th Meeting Belfast, 1986, y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach To Targeted Drug Delivery", en: "Directed Drug Delivery", Borchardt et al., (eds), páginas 247 a 267 (Humana Press, 1985). Se describen ejemplos no limitativos de combinaciones de enzima/profármaco/fármaco anticáncer activo en, por ejemplo, Rooseboom et al., *Pharmacol. Reviews* 56: 53-102, 2004).

Entre os ejemplos de enzimas activadores de profármaco se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, nitrorreductasa, citocromo P450, nucleósido purina fosforilasa, timidina quinasa, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa carboxipeptidasa, penicilina amidasa, β -lactamasa, citosina desaminasa y metionina γ -liasa.

Entre los ejemplos de fármacos anticáncer que pueden formarse in vivo mediante la activación de un profármaco por un enzima activador de profármaco se incluyen, aunque sin limitación, 5-(aziridín-1-il)-4-hidroxil-amino-2-nitro-benzamida, mostaza isofosforamida, mostaza fosforamida, 2-fluoroadenina, 6-metilpurina, ganciclovir-nucleótido trifosfato, etopósido, mitomicina C,- p-[N,N-bis(2-cloroetil)amino]fenil (POM), doxorubicina, oxalidina, 9-aminocamptotecina, mostaza, metotrexato, mostaza ácido benzoico, doxorubicina, adriamicina, daunomicina, carminomicina, bleomicinas, esperamicinas, melfalán, palitoxina, hidrazida de ácido 4-desacetilvinblastín-3-carboxílico, mostaza fenilendiamina, 4'-carboxifitalato(1,2-ciclohexán-diamín)platino, taxol, 5-fluorouracilo, metilselenol y difluoruro carbonotiónico.

b. Agentes antiangiogénicos

En determinadas realizaciones, un agente terapéutico (por ejemplo anticáncer) dentro de un conjugado de clorotoxina de la presente invención comprende un agente antiangiogénico. Entre los agentes antiangiogénicos adecuados para la utilización en la presente invención se incluye cualquier molécula, compuesto o factor que bloquee, inhiba, enlentezca o reduzca el proceso de la angiogénesis, o el proceso por el que se forman nuevos vasos sanguíneos mediante el desarrollo a partir de vasos preexistentes. Dicha molécula, compuesto o factor puede bloquear la angiogénesis mediante el bloqueo, inhibición, enlentecimiento o reducción de cualquiera de las etapas que implica la angiogénesis, incluyendo (aunque sin limitación) las etapas de (1) disolución de la membrana del vaso originario, (2) migración y proliferación de las células endoteliales, y (3) formación de nueva vasculatura por las células migrantes

Entre los ejemplos de agentes antiangiogénicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, bevacizumab (AVASTIN[®]), celecoxib (CELEBREX[®]), endostatina, talidomida, EMD121974 (Cilengitide), TNP-470, escualamina, combretastatina A4, interferón- α , anticuerpo anti-FCEV, SU5416, SU6668, PTK787/2K 22584, Marimistal, AG3340, COL-3, Neovastat y BMS-275291.

Los agentes antiangiogénicos pueden utilizarse en una diversidad de contextos terapéuticos, incluyendo, aunque sin limitación, terapias anticáncer y terapias para la degeneración macular.

Tal como reconocerá el experto en la materia, los ejemplos específicos de agentes terapéuticos citados en la presente memoria representan únicamente un número muy pequeño de los agentes terapéuticos que resultan adecuados para la utilización en la práctica de la presente invención.

5 2. Fracciones detectables

En el quinto aspecto de la invención, los conjugados proporcionados comprenden una o más entidades o fracciones detectables, es decir, conjugados que se "marcan" con dichas entidades o fracciones. Dichos conjugados resultan útiles en aplicaciones diagnósticas.

10 Puede utilizarse cualquiera de entre una amplia diversidad de agentes detectables en la práctica de la presente invención. Entre los agentes detectables adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, diversos ligandos, radionucleidos, pigmentos fluorescentes, agentes quimioluminiscentes (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio, dioxetanos estabilizados y similares), agentes bioluminiscentes, nanocristales semiconductores fluorescentes inorgánicos espectralmente resolubles (es decir, puntos cuánticos); microparticulas, nanoparticulas de metal (por ejemplo oro, plata, cobre, platino, etc.), nanoagregados, iones metálicos paramagnéticos, enzimas, marcajes colorimétricos (tales como, por ejemplo, pigmentos, oro coloidal y similares), biotina, digoxigenina, haptenos y proteínas para las que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales.

20 a. Isótopos o iones radioactivos y/o paramagnéticos

En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina se marca con un isótopo o ión radioactivo y/o paramagnético. Por ejemplo, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina puede marcarse isotópicamente (es decir, puede contener uno o más átomos que han sido sustituidos por un átomo que presenta una masa atómica o número másico diferentes de la masa atómica o número másico habitualmente observado en la naturaleza) o puede unirse un isótopo al polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina. Entre los ejemplos no limitativos de isótopos que pueden incorporarse en los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina se incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, flúor, fósforo, cobre, galio, itrio, tecnecio, indio, yodo, renio, talio, bismuto, astato, samario y lutecio (es decir, ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I , ^{123}I , ^{129}I , ^{131}I , ^{135}I , ^{186}Re , ^{187}Re , ^{201}Tl , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{153}Sm y ^{177}Lu).

En determinadas realizaciones, los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina comprenden un radioisótopo que es detectable mediante tomografía computerizada de emisión de fotones únicos (SPECT, por sus siglas en inglés) o mediante tomografía de emisión de positrones (TEP). Entre los ejemplos de dichos radionucleidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, yodo-131 (^{131}I), yodo 125 (^{125}I), bismuto-212 (^{212}Bi), bismuto-213 (^{213}Bi), astato-221 (^{221}At), cobre-67 (^{67}Cu), cobre-64 (^{64}Cu), renio-186 (^{186}Re), renio-188 (^{188}Re), fósforo-32 (^{32}P), samario-153 (^{153}Sm), lutecio-177 (^{177}Lu), tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), galio-67 (^{67}Ga), indio-111 (^{111}In) y talio-201 (^{201}Tl).

En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina se marca con un radioisótopo que es detectable mediante una cámara gamma. Entre los ejemplos de dichos radioisótopos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, yodo-131 (^{131}I), y tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$).

En determinadas realizaciones, se marca un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina con un ión metálico paramagnético que sea un buen potenciador de contraste en las imágenes de resonancia magnética (IRM). Entre los ejemplos de dichos iones metálicos paramagnéticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, gadolinio III (Gd^{3+}), cromo III (Cr^{3+}), disprosio III (Dy^{3+}), hierro III (Fe^{3+}), manganeso II (Mn^{2+}), e iterbio III (Yb^{3+}). En determinadas realizaciones, las fracciones de marcaje comprenden gadolinio III (Gd^{3+}). El gadolinio es un agente de contraste autorizado por la FDA para las IRM, que se acumula en los tejidos anormales, provocando que estas áreas anormales se vuelvan muy brillantes (resaltadas) en la imagen de resonancia magnética. Es conocido que el gadolinio proporciona un gran contraste entre los tejidos normales y anormales en diferentes áreas del cuerpo, en particular en el cerebro.

En determinadas realizaciones, un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina se marca con un isótopo paramagnético estable que es detectable mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (ERM). Entre los ejemplos de isótopos paramagnéticos estables adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carbono-13 (^{13}C) y flúor-19 (^{19}F).

En algunas realizaciones, los isótopos metálicos se unen no covalentemente al conjugado de clorotoxina de contenido reducido de lisina mediante quelación. Entre los ejemplos de quelación se incluyen la quelación de un isótopo metálico a una región poli-His fusionada con un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina.

En algunas realizaciones, se incorpora un metal, tal como gadolinio (Gd) en un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina mediante enlace covalente o mediante quelación, tal como se ha indicado anteriormente.

65

b. Pigmentos fluorescentes

En determinadas realizaciones, se marca un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina con un pigmento fluorescente. Numerosos pigmentos fluorescentes conocidos de una amplia diversidad de estructuras químicas y características físicas resultan adecuados para la utilización en la práctica de la presente invención. Entre los pigmentos fluorescentes adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, fluoresceína y pigmentos de fluoresceína (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína o FITC, naftofluoresceína, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína o FAM, etc.), carbocianina, merocianina, pigmentos de estirilo, pigmentos de oxonol, ficoeritrina, eritrosina, eosina, pigmentos de rodamina (por ejemplo carboxitetrametil-rodamina o TAMRA, carboxi-rodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), lisamina rodamina B, rodamina 6G, verde rodamina, rojo rodamina, tetrametilrodamina (TMR), etc.), coumarina y pigmentos de coumarina (por ejemplo metoxicoumarina, dialquilaminocoumarina, hidroxicoumarina, aminometilcoumarina (AMCA), etc.), pigmentos de verde Oregón (por ejemplo verde Oregón 488, verde Oregón 500, verde Oregón 514, etc.), rojo Texas, rojo Texas X, SPECTRUM RED™, SPECTRUM GREEN™, pigmentos de cianina (por ejemplo, CY-3™, CY-5™, CY-3.5™, CY-5.5™, etc.), pigmentos ALEXA FLUOR™ (por ejemplo, ALEXA FLUOR™ 350, ALEXA FLUOR™ 488, ALEXA FLUOR™ 532, ALEXA FLUOR™ 546, ALEXA FLUOR™ 568, ALEXA FLUOR™ 594, ALEXA FLUOR™ 633, ALEXA FLUOR™ 660, ALEXA FLUOR™ 680, etc.), pigmentos BODIPY™ (por ejemplo, BODIPY™ FL, BODIPY™ R6G, BODIPY™ TMR, BODIPY™ TR, BODIPY™ 530/550, BODIPY™ 558/568, BODIPY™ 564/570, BODIPY™ 576/589, BODIPY™ 581/591, BODIPY™ 630/650, BODIPY™ 650/665, etc.), pigmentos IRD (por ejemplo, IRD40, IRD 700, IRD 800, etc.) y similares. Para más ejemplos de pigmentos fluorescentes adecuados y métodos para el acoplamiento de pigmentos fluorescentes con otras entidades químicas, tales como proteínas y péptidos, ver, por ejemplo, "The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products", 9a ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. Entre las propiedades favorables de los agentes de marcaje fluorescente se incluyen un elevado coeficiente de absorción molar, un rendimiento cuántico de fluorescencia elevado y fotoestabilidad. En algunas realizaciones, los fluoróforos de marcaje muestran longitudes de onda de absorción y de emisión en el rango visible (es decir, entre 400 y 750 nm) y no en el rango ultravioleta del espectro (es decir, inferior a 400 nm).

c. Enzimas

En determinadas realizaciones, se marca un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina con un enzima. Entre los ejemplos de enzimas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los utilizados en un ELISA, por ejemplo peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, etc. Entre otros ejemplos se incluyen beta-glucuronidasa, beta-D-glucosidasa, ureasa, glucosa oxidasa, etc. Puede conjugarse un enzima con un polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina utilizando un grupo conector, tal como carbodiimida, un diisocianato, un glutaraldehído y similares.

El experto ordinario en la materia reconocerá que, en algunas realizaciones, una entidad o fracción no clorotoxina particular puede servir a más de un propósito. Por ejemplo, una fracción puede presentar tanto un propósito terapéutico como un propósito diagnóstico. A título de ejemplo, se ha utilizado un yodo radioactivo, tal como ¹³¹I, tanto como marcaje radioactivo como agente terapéutico citotóxico dentro de un conjugado de clorotoxina en el tratamiento de una diversidad de tumores, incluyendo el glioma maligno.

(III) Composiciones farmacéuticas

Los conjugados de clorotoxina indicados en la presente memoria pueden administrarse per se y/o en forma de una composición farmacéutica. En el tercer aspecto de la invención proporcionado se encuentran composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de por lo menos un conjugado de clorotoxina y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Un conjugado de clorotoxina, o una composición farmacéutica del mismo, puede administrarse según la presente invención en las cantidades y durante los tiempos necesarios o suficientes para conseguir por lo menos el resultado deseado. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse en las cantidades y durante el tiempo mediante los que elimina las células de cáncer, reduce el tamaño tumoral, inhibe el crecimiento o metástasis tumoral, trata diversas leucemias y/o prolonga el tiempo de supervivencia de los mamíferos (incluyendo seres humanos) con dichas enfermedades o, de otro modo, rinde un beneficio clínico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse utilizando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaces para conseguir el efecto terapéutico deseado.

La cantidad exacta de la composición farmacéutica que debe administrarse variará de sujeto a sujeto dependiendo de la especie, edad y condición general del sujeto, la gravedad de la condición y similares (ver posteriormente).

La formulación farmacéutica óptima puede modificarse dependiendo de la vía de administración y la dosis deseada. Dichas formulaciones pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación in vivo y la tasa de eliminación in vivo de los compuestos administrados.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en forma de administración unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de las dosis. La expresión "forma de administración unitaria", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una unidad físicamente discreta de conjugado de clorotoxina (con o sin uno o más agentes adicionales) para el paciente que debe tratarse. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de las composiciones de la presente invención será decisión del médico responsable dentro del alcance del juicio médico razonable.

Tras la formulación con uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables apropiados en una dosis deseada, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en seres humanos u otros mamíferos mediante cualquier vía adecuada. Se conocen diversos sistemas de administración, que pueden utilizarse para administrar dichas composiciones, incluyendo tabletas, cápsulas, soluciones inyectables, etc. Entre los métodos de administración se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las vías dérmica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, pulmonar, epidural, ocular y oral. Puede administrarse una composición por cualquier vía conveniente o de otro modo apropiada, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo oral, mucosa, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse conjuntamente con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica y/o local.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la técnica conocida utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados, y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución en 2,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden utilizarse se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, pueden utilizarse convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Con este fin puede utilizarse cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, de manera similar pueden utilizarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Los portadores líquidos estériles resultan útiles en líquidos estériles de composiciones para la administración parenteral.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizadores en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril o en otro medio inyectable estéril antes de la utilización. Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles pueden administrarse mediante inyección, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. La inyección puede llevarse a cabo en bolo único o mediante infusión directa (por ejemplo la infusión intravenosa durante 30 minutos). En caso necesario, la composición puede incluir un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Con el fin de prolongar el efecto del fármaco, con frecuencia resulta deseable retrasar la absorción del fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la utilización de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo de baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende en este caso de su tasa de disolución, que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, el retraso de la absorción de una forma de fármaco administrada parenteralmente puede conseguirse disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo aceitoso. Las formas de depósito inyectable se preparan mediante la formación de matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular utilizado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Entre los ejemplos de otros polímeros biodegradables se incluyen los poli(ortoésteres) y los poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectable también pueden prepararse atrapando el fármaco en liposomas (también conocidos como vesículas lipídicas) o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Entre las formas de administración líquidas para la administración oral se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo (es decir, el conjugado), la forma de administración líquida puede contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otro solvente, agentes solubilizadores y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencilico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y mezclas de los mismos. Aparte de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir además adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes de suspensión, conservantes, edulcorantes, saborizantes y perfumantes, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizadores u osmorreguladores. Entre los ejemplos adecuados de portadores líquidos para la administración oral se incluyen agua (que contiene parcialmente aditivos tal como anteriormente, por ejemplo derivados de celulosa, tales como solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, tales como glicoles) y derivados de los mismos, y aceites (por ejemplo aceite de coco fraccionado y aceite de araquis).

Entre las formas de administración adecuadas para la administración oral se incluyen, por ejemplo, cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de administración sólidas, los ingredientes activos se mezclan con por lo menos un excipiente o portador fisiológicamente aceptable inerte, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y uno o más de entre: (a) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) ligantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia, (c) humectantes, tales como glicerol, (d) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido alginico, determinados silicatos y carbonato sódico, (e) agentes retardantes de la solución, tales como parafina, (f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita, e (i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico y mezclas de los mismos.

Entre los excipientes adicionales o alternativos adecuados para las formulaciones sólidas se incluyen los agentes modificadores de superficie, tales como los agentes modificadores de superficie no iónicos y aniónicos. Entre los ejemplos representativos de agentes modificadores de superficie se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, poloxámero 188, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetosteárico, cera emulsionante cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato sódico, aluminosilicato de magnesio y trietanolamina. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, la forma de administración puede comprender además agentes tamponadores. La cantidad de portador sólido por cada forma de administración sólida varía ampliamente. En algunas realizaciones, la cantidad de portador sólido por cada forma de administración es de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 1 g.

También pueden utilizarse composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina rellena blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de administración sólidas tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cáscaras, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos de la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificadores y también pueden presentar una composición que permite que liberen el ingrediente o ingredientes activos exclusivamente, o preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente de manera retardada. Entre los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse se incluyen sustancias poliméricas y ceras.

En determinadas realizaciones, puede resultar deseable administrar una composición inventiva localmente en un área que requiera tratamiento. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, infusión local durante la cirugía, mediante aplicación tópica, mediante inyección, mediante un catéter, mediante supositorio o mediante un parche en la piel o stent u otro implante, entre otras maneras.

Algunas composiciones para la administración tópica pueden formularse en forma de un gel, una pomada, una loción o una crema que puede incluir portadores tales como agua, glicerol, alcohol, propilenglicol, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres de ácido graso o aceite mineral. Entre otros portadores tópicos se incluyen petróleo líquido, palmitato de isopropilo, polietilenglicol, etanol (al 95%), monolaurato de polioxietileno (al 5%) en agua o laurilsulfato sódico (al 5%) en agua. Otros materiales, tales como antioxidantes, humectantes, estabilizadores de la viscosidad y agentes similares, pueden añadirse según se requiera. También pueden incluirse intensificadores de la penetración percutánea tales como azona.

Además, en determinados casos, las composiciones pueden disponerse dentro de dispositivos transdérmicos colocados sobre, en o dentro de la piel. Entre dichos dispositivos se incluyen parches, implantes e inyecciones que liberan el compuesto en la piel, mediante mecanismos de liberación pasiva o activa. Entre las administraciones transdérmicas se incluyen todas las administraciones a través de la superficie del cuerpo y los revestimientos internos de paso corporal, incluyendo los tejidos epitelial y mucosal. Dichas administraciones pueden llevarse a cabo utilizando las presentes composiciones en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones y supositorios (rectales y vaginales).

La administración transdérmica puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, la utilización de un parche transdérmico que contiene uno o más ingredientes activos y un portador que no resulta tóxico para la piel y permite la administración de por lo menos parte del ingrediente o ingredientes activos para la absorción sistémica en el caudal sanguíneo a través de la piel. El portador puede adoptar cualquiera de entre varias formas, tales como cremas y pomadas, pastas, geles y dispositivos oclusivos. Las cremas y pomadas pueden ser emulsiones líquidas o semisólidas viscosas del tipo aceite-en-agua o del tipo agua-en-aceite. Las pastas que comprenden polvos absorbentes dispersados en petróleo o petróleo hidrofílico que contiene el ingrediente o ingredientes activos también pueden resultar adecuadas. Puede utilizarse una diversidad de dispositivos oclusivos para liberar el ingrediente o ingredientes activos en el caudal sanguíneo, tal como una membrana semipermeable que cubra un reservorio que contiene el ingrediente o ingredientes activos con o sin un portador o una matriz que contiene el ingrediente activo.

Las formulaciones de supositorio pueden prepararse a partir de materiales tradicionales, incluyendo manteca de cacao, con o sin la adición de ceras para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. También pueden utilizarse bases de supositorio solubles en agua, tales como polietilenglicoles de diversos pesos moleculares.

- 5 Los materiales y métodos para producir diversas formulaciones son conocidos de la técnica y pueden adaptarse para la práctica de la presente invención.

Agentes encapsulantes

- 10 En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas por la presente invención incluyen uno o más agentes encapsulantes. En general, un agente encapsulante puede ser cualquier agente fisiológicamente tolerable que pueda utilizarse para atrapar una entidad, tal como un conjugado o una fracción. El término "atrapado" se refiere a que el agente encapsulante puede rodear o circunscribir la entidad, o una entidad "atrapada" puede encontrarse incluida parcial o totalmente dentro del material que comprende el agente encapsulante.

- 15 En algunas realizaciones, el agente encapsulante es parte de la fracción (tal como la fracción terapéutica), y el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina está conjugado con el agente encapsulante. En algunas de dichas realizaciones, el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina está conjugado con la superficie externa del agente encapsulante. En algunas de dichas realizaciones, el polipéptido clorotoxina de contenido reducido en lisina está expuesto al medio externo al agente encapsulante. El polipéptido clorotoxina de contenido reducido en lisina puede conjugarse con el agente encapsulante mediante una interacción directa (que puede ser no covalente o covalente) o puede conjugarse con el agente encapsulante mediante un conector.

- 20 En algunas realizaciones, el conjugado que comprende el polipéptido clorotoxina de contenido reducido en lisina y la fracción (por ejemplo la fracción terapéutica) está encerrado por el agente encapsulante. El conjugado puede encontrarse parcial o totalmente encerrado dentro de un espacio o medio (por ejemplo un medio acuoso) definido y/o creado por el agente encapsulante. En algunas realizaciones, el conjugado se encuentra por lo menos parcialmente incluido dentro del agente encapsulante. Por ejemplo, en el caso de que el agente encapsulante comprenda membranas lipídicas, el conjugado puede encontrarse por lo menos parcialmente incluido dentro o entre moléculas de lípidos en la membrana. En algunas realizaciones, el conjugado está totalmente incluido dentro del agente encapsulante.

- 25 Se conoce de la técnica una diversidad de tipos de agente encapsulante, al igual que métodos de utilización de dichos agentes para atrapar fármacos, biomoléculas y similares. En determinadas realizaciones, el agente encapsulante comprende una partícula pequeña que presenta un núcleo y una superficie. Entre dichos agentes encapsulantes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, liposomas, micelas, micropartículas, nanopartículas, etc.

- 30 Los liposomas típicamente son estructuras bicapa o vesículas de forma aproximadamente esférica y que comprenden membranas fosfolipídicas naturales o sintéticas. Los liposomas pueden comprender además otros componentes membranales, tales como colesterol y proteínas. El núcleo interno de los liposomas típicamente contiene una solución acuosa. Los agentes y/o conjugados terapéuticos pueden disolverse en la solución acuosa. Tal como se ha indicado anteriormente, los agentes terapéuticos y conjugados pueden incluirse dentro de la membrana del liposoma. Los liposomas pueden resultar especialmente útiles para administrar agentes tales como agentes ácidos nucleicos (tales como los indicados anteriormente), incluyendo ARN inhibidores, tales como ARNip.

- 35 Las micelas son similares a los liposomas, excepto en que generalmente se forman a partir de una única capa de fosfolípidos y no presentan una solución acuosa interna. Las micelas inversas que se preparan para que incluyan una solución acuosa interna también pueden utilizarse según la presente invención.

- 40 En algunas realizaciones, la partícula es una micropartícula, por lo menos una dimensión de la cual de promedio es menor de aproximadamente 1 μm . Por ejemplo, la dimensión más pequeña de las partículas puede ser de promedio de aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 140 nm, de aproximadamente 160 nm, de aproximadamente 180 nm, de aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 220 nm, de aproximadamente 240 nm, de aproximadamente 260 nm, de aproximadamente 280 nm, de aproximadamente 300 nm, de aproximadamente 320 nm, de aproximadamente 340 nm, de aproximadamente 360 nm, de aproximadamente 380 nm, de aproximadamente 400 nm, de aproximadamente 420 nm, de aproximadamente 440 nm, de aproximadamente 460 nm, de aproximadamente 480 nm, de aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 550 nm, de aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 650 nm, de aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 750 nm, de aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 850 nm, de aproximadamente 900 nm o de aproximadamente 950 nm.

- 45 En algunas realizaciones, la partícula es una nanopartícula, por lo menos una dimensión de la cual es de promedio inferior a aproximadamente 100 μm . Por ejemplo, la dimensión más pequeña de las partículas puede ser de promedio de aproximadamente 1 nm, aproximadamente 2 nm, de aproximadamente 3 nm, de aproximadamente 4 nm, de aproximadamente 5 nm, de aproximadamente 6 nm, de aproximadamente 7 nm, de aproximadamente 8 nm, de aproximadamente 9 nm, de aproximadamente 10 nm, de aproximadamente 11 nm, de aproximadamente 12 nm,

de aproximadamente 13nm, de aproximadamente 14 nm, de aproximadamente 15 nm, de aproximadamente 16 nm, de aproximadamente 17 nm, de aproximadamente 18 nm, de aproximadamente 19 nm, de aproximadamente 20 nm, de aproximadamente 22 nm, de aproximadamente 24 nm, de aproximadamente 26 nm, de aproximadamente 28 nm, de aproximadamente 30 nm, de aproximadamente 32 nm, de aproximadamente 34 nm, de aproximadamente 36 nm, de aproximadamente 38 nm, de aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 42 nm, de aproximadamente 44 nm, de aproximadamente 46 nm, de aproximadamente 48 nm, de aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 55 nm, de aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 65 nm, de aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 75 nm, de aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 85 nm, de aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 95 nm o de aproximadamente 99 nm.

En algunas realizaciones, el núcleo de la partícula comprende un material que presenta actividad de resonancia magnética, que puede resultar ventajoso en aplicaciones diagnósticas y/o terapéuticas. Entre los materiales que presentan actividad de resonancia magnética se incluyen metales y sus óxidos, tales como metales que contienen aluminio, cobalto, indio, hierro, cobre, germanio, manganeso, níquel, estaño, titanio, paladio, platino, selenio, silicio, plata, cinc, etc.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos comprenden ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden estar totalmente encerrados dentro del agente encapsulante. En algunas realizaciones, los agentes ácidos nucleicos se incluyen dentro del agente encapsulante. Por ejemplo, el agente encapsulante puede ser un liposoma y el agente nucleico puede estar encerrado dentro del liposoma. El agente ácido nucleico puede estar por lo menos parcialmente incluido dentro de las moléculas lipídicas del liposoma.

Paquetes o kits farmacéuticos

En la presente memoria se da a conocer un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes (por ejemplo viales, ampollas, probetas, matraces o botellas) que contienen uno o más ingredientes de una composición farmacéutica tal como se indica en la presente memoria, permitiendo la administración de un conjugado de clorotoxina de la presente invención.

IV. Utilización de conjugados de clorotoxinas

En el cuarto aspecto de la invención, el conjugado o composición farmacéutica de la invención está destinado a la utilización en un método de tratamiento de un individuo que presenta o que se sospecha que presenta un tumor, de manera que el conjugado se une específicamente al tumor. En algunas realizaciones, dichos métodos resultan útiles en el tratamiento y/o diagnóstico del cáncer. En algunas realizaciones, dichos métodos resultan útiles para reducir la probabilidad de que el individuo desarrolle un tumor, de que uno o más tumores en el individuo se incrementen de tamaño, de que uno o más tumores en el individuo metastaticen y/o de que el cáncer progrese según cualquier otra medida (tal como el estadio clínico).

Alternativamente, el conjugado o composición farmacéutica está destinado a la utilización en un método de tratamiento de un individuo que presenta o que se sospecha que presenta una enfermedad o condición caracterizada por la angiogénesis aberrante, de manera que el conjugado de clorotoxina reduce el grado de la angiogénesis. En algunas realizaciones, el conjugado de clorotoxina evita la formación de neovasculatura. En algunas realizaciones, el conjugado de clorotoxina provoca la regresión de la neovasculatura existente.

A. Dosis y administración

Las composiciones según la presente invención pueden administrarse según un régimen que consiste de una sola dosis o de una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo.

Los conjugados de clorotoxina o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse utilizando cualquier vía de administración eficaz para conseguir el efecto deseado (por ejemplo terapéutico, diagnóstico, etc.). En determinadas realizaciones de la invención, los conjugados de clorotoxina (o composiciones farmacéuticas de los mismos) se administran sistémicamente. Entre las vías de administración sistémica típicas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las vías intramuscular, intravenosa, pulmonar y oral. La administración sistémica también puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, infusión o inyección de bolo, o mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo la mucosa oral, rectal e intestinal, etc.). En determinadas realizaciones, el conjugado de clorotoxina se administra por vía intravenosa.

Alternativa o adicionalmente, también pueden utilizarse otras vías de administración. En determinadas realizaciones, el conjugado de clorotoxina se administra por una vía seleccionada de entre el grupo que consiste de intravenosa, intracraneal (incluyendo intracavitaria), intramuscular, intratumoral, subcutánea, intraocular, periocular, aplicación tópica, o mediante combinaciones de las mismas.

Tal como se comenta posteriormente, puede resultar deseable reducir el grado de la angiogénesis en las enfermedades de neovascularización ocular. En algunas realizaciones, los conjugados de clorotoxina pueden

administrarse en el ojo. La administración en el ojo puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando vías intraocular y/o periocular, tal como la inyección intravítrea, la inyección subconjuntival, etc. La aplicación tópica de agentes clorotoxina en el ojo también puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, gotas oculares.

- 5 Las vías oculares de administración pueden resultar particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades de neovascularización ocular, tales como la degeneración macular.

La administración puede ser una o múltiples veces al día, a la semana (o en algún otro intervalo múltiplo de un día) o en un programa intermitente. Por ejemplo, una composición puede administrarse una o más veces al día de manera
10 semanal durante un periodo de semanas (por ejemplo 4 a 10 semanas). Alternativamente, una composición puede administrarse diariamente durante un periodo de días (por ejemplo 1 a 10 días) seguido de un periodo de días (por ejemplo 1 a 30 días) sin administración, repitiendo dicho ciclo un número dado de veces (por ejemplo 2 a 10 ciclos). En algunas realizaciones, se administran por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco o por lo menos seis dosis. En algunas realizaciones, la composición se administra semanalmente durante por
15 lo menos dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas o seis semanas.

La administración puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, o en cualquier combinación de maneras, tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o similar), la administración oral
20 y/o la administración intracavitaria.

Dependiendo de la vía de administración, pueden calcularse las dosis eficaces según la función del órgano, el peso corporal o la superficie de cuerpo del sujeto que debe tratarse. La optimización de las dosis apropiadas puede ser fácilmente llevada a cabo por el experto en la materia a la luz de los datos farmacocinéticos observados en ensayos
25 clínicos con seres humanos. El régimen final de administración podrá ser determinado por el médico responsable considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo la actividad específica del fármaco, la gravedad de los daños y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, la condición, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección actual, el tiempo de administración, la utilización (o no) de terapias concomitantes y otros factores clínicos.

30 Los intervalos de dosis típicos son de entre aproximadamente 1,0 pg/kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal (las dosis se presentan en la presente memoria en términos del peso de la parte polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina del conjugado).

Por ejemplo, para la administración sistémica, las dosis típicas son de entre aproximadamente 100,0 ng/kg de peso corporal y aproximadamente 10,0 mg/kg de peso corporal. Por ejemplo, en determinadas realizaciones en las que se
35 administra por vía intravenosa un conjugado de clorotoxina, la administración del agente puede comprender la administración de una o más dosis que comprenden entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, por ejemplo entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 4 mg/kg, entre aproximadamente 0,02 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg, entre
40 aproximadamente 0,03 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg o entre aproximadamente 0,03 mg/kg y aproximadamente 1,5 mg/kg de clorotoxina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede administrarse una o más dosis de conjugado de clorotoxina, conteniendo cada una aproximadamente 0,002 mg/kg, aproximadamente 0,004 mg/kg, aproximadamente 0,006 mg/kg, aproximadamente 0,008 mg/kg, aproximadamente 0,009 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg o más de 0,02 mg/kg de clorotoxina. En algunas
45 realizaciones, puede administrarse una o más dosis de conjugado de clorotoxina, conteniendo cada una aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg o más de 1,0 mg/kg de clorotoxina. En algunas realizaciones, puede administrarse una o más dosis de conjugado de clorotoxina, conteniendo cada una aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,10 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg, aproximadamente 0,20 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,30 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg, aproximadamente 0,40 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg, aproximadamente 0,50 mg/kg, aproximadamente 0,55 mg/kg, aproximadamente 0,60 mg/kg, aproximadamente 0,65 mg/kg, aproximadamente 0,70 mg/kg, aproximadamente 0,75 mg/kg, aproximadamente 0,80 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg, aproximadamente 0,90 mg/kg, aproximadamente 0,95 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, o más de
50 aproximadamente 1 mg/kg de clorotoxina. En otras realizaciones, puede administrarse una o más dosis de conjugado de clorotoxina, conteniendo cada una aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,05 mg/kg, aproximadamente 1,10 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg, aproximadamente 1,20 mg/kg, aproximadamente 1,25 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg, aproximadamente 1,40 mg/kg, aproximadamente 1,45 mg/kg, aproximadamente 1,50 mg/kg, o más de aproximadamente 1,50 mg/kg de clorotoxina. En dichas realizaciones, el tratamiento puede comprender la administración de una única dosis de conjugado de clorotoxina o la administración de 2 dosis, 3 dosis, 4 dosis, 5 dosis, 6 dosis o más de 6 dosis. Pueden administrarse dos dosis consecutivas a un intervalo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más de 7
60 días (por ejemplo 10 días, 2 semanas o más de 2 semanas).

65

Para la administración directa en el sitio mediante microinfusión, las dosis típicas son de entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal.

5 En determinadas realizaciones en las que el conjugado de clorotoxina se administra localmente, en particular en casos de administración intracavitaria en el cerebro, la administración del conjugado puede comprender la administración de una o más dosis que comprenden entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 100 mg de polipéptido clorotoxina, por ejemplo entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 25 mg, entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 10 mg, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg, o entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 1,0 mg. 10 Por ejemplo, en determinadas realizaciones, puede administrarse una o más dosis de conjugado de clorotoxina, conteniendo cada una aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 3,5 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 4,5 mg o aproximadamente 5 mg de polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina. En algunas realizaciones, puede administrarse una o más dosis de conjugado de clorotoxina, conteniendo cada una 15 aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,15 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,25 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,35 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,45 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,55 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,65 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,75 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,85 mg, aproximadamente 0,9 mg, aproximadamente 0,95 mg o aproximadamente 1 mg de polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina. En algunas realizaciones, un tratamiento puede comprender la administración de una 20 única dosis de conjugado de clorotoxina o la administración de 2, 3, 4, 5, 6 o más de 6 dosis. Pueden administrarse dos dosis consecutivas a un intervalo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más de 7 días (por ejemplo 10 días, 2 semanas o más de 2 semanas). En algunas realizaciones, se administran múltiples dosis y la cantidad de polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina administrada no es la misma para cada dosis. Por 25 ejemplo, en algunas realizaciones, las dosis pueden ajustarse (por ejemplo escalarse o reducirse) entre una dosis y otra según determine el médico responsable.

Se apreciará que las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en combinación con terapias adicionales (es decir, el tratamiento según la presente invención puede administrarse concurrentemente con, antes o después de uno o más procedimientos terapéuticos o médicos deseados). La combinación de terapias 30 particular (terapéuticos y/o procedimientos) para la utilización en dicho régimen de combinación considerará la compatibilidad de los terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que debe alcanzarse.

35 Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse conjuntamente con otros procedimientos, incluyendo cirugía, radioterapia (por ejemplo radiación y, radioterapia de haz de protones, radioterapia de haz de electrones, terapia de protones, braquiterapia e isótopos radioactivos sistémicos), terapia endocrina, hipertermia y crioterapia.

40 Alternativa o adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse conjuntamente con otros agentes para atenuar cualesquiera efectos adversos (por ejemplo antieméticos) y/o con otros fármacos quimioterapéuticos autorizados, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, fármacos alquilantes (mecloretamina, cloramubicilo, ciclofosfamida, melfalán e ifosfamida), antimetabolitos (metotrexato), antagonistas de purina y antagonistas de pirimidina (6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, citarabina y gemcitabina), venenos del huso 45 (vinblastina, vincristina, vinorelbina y paclitaxel), podofilotoxinas (etopósido, irinotecán y topotecán), antibióticos (doxorubicina, bleomicina y mitomicina), nitrosoureas (carmustina y lomustina), iones inorgánicos (cisplatino y carboplatino), enzimas (asparaginasa) y hormonas (tamoxifeno, leuprolido, flutamida y megestrol), entre otros. Para un comentario más completo de las terapias del cáncer actuales, ver <http://www.cancer.gov/>, una lista de los fármacos oncológicos autorizados por la FDA en <http://www.fda.gov/cder/cancer/druglistframe.htm>, y la obra The Merck Manual, edición décimoséptima, 1999. 50

Las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse conjuntamente con una o más combinaciones adicionales de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento. En algunas realizaciones, la combinación adicional de agentes citotóxicos se selecciona de entre: CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y procarbazona), CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), COP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina y prednisona), m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorina), ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona), ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina y vincristina), MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina), MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona), ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona) alternada con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina y vinblastina), MOPP (mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona) alternada con ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), Ch1VPP (cloramubicilo, vinblastina, procarbazona y prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido); MIMM (metil-gag, ifosfamida, metotrexato y etopósido); 65

DHAP (dexametasona, dosis alta de citarabina y cisplatino), ESHAP (etopósido, metilpredisolona, dosis alta de citarabina y cisplatino), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina), CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona), CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), ESHOP (etopósido, metilpredisolona, dosis alta de citarabina, vincristina y cisplatino), EPOCH (etopósido, vincristina y doxorubicina durante 96 horas con dosis de bolo de ciclofosfamida y prednisona oral), ICE (ifosfamida, ciclofosfamida y etopósido), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina), CHOP-B (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y bleomicina), CEPP-B (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona y bleomicina) y P/DOCE (epirubicina o doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida y prednisona).

10 B. Indicaciones

Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse en una diversidad de contextos antiproliferativos y/o antiangiogénicos para tratar y/o diagnosticar enfermedades o condiciones.

15 1. Contextos antiproliferativos

En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención se utilizan para tratar y/o diagnosticar condiciones que implican la proliferación celular incontrolada, tal como cánceres primarios y/o metastásicos, y otras condiciones cancerosas. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención deberían resultar útiles para reducir el tamaño de los tumores sólidos, inhibir el crecimiento o metástasis tumoral, tratar diversos cánceres linfáticos y/o prolongar el tiempo de supervivencia de mamíferos (incluyendo seres humanos) que sufren de dichas enfermedades.

Entre los ejemplos de cánceres y condiciones de cáncer que pueden tratarse y/o diagnosticarse según la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, tumores del cerebro y del sistema nervioso central (por ejemplo tumores de las meninges, cerebro, médula espinal, nervios craneales y otras partes del SNC, tales como glioblastomas o meduloblastomas), cáncer de cabeza y/o cáncer de cuello, tumores de mama, tumores del sistema circulatorio (por ejemplo corazón, mediastino y pleura, y otros órganos intratorácicos, tumores vasculares y tejido vascular asociado a tumor), tumores del sistema sanguíneo y linfático (por ejemplo la enfermedad de Hodgkin, el linfoma de la enfermedad no de Hodgkin, el linfoma de Burkitt, linfomas relacionados con el SIDA, enfermedades inmunoproliferativas malignas, mieloma múltiple y neoplasmas de células plasmáticas malignos, leucemia linfoide, leucemia mieloide, leucemia linfocítica aguda o crónica, leucemia monocítica, otras leucemias de tipo celular específico, leucemia de tipo celular no específico, neoplasmas malignos no especificados de tejidos linfoides, hematopoyéticos y relacionados, tales como linfoma de células grandes difuso, linfoma de células T o linfoma de células T cutáneo), tumores del sistema excretor (por ejemplo riñón, pelvis renal, uréter, vejiga y otros órganos urinarios), tumores del tracto gastrointestinal (por ejemplo esófago, estómago, intestino delgado, colon, colorrectal, unión rectosigmoidal, recto, ano y canal anal), tumores que implican el hígado y la glándula biliar intrahepática, vesícula biliar y otras partes del tracto biliar, páncreas y otros órganos digestivos, tumores de la cavidad oral (por ejemplo labio, lengua, encía, suelo de la boca, paladar, glándula parótida, glándulas salivares, amígdalas, orofaringe, nasofaringe, seno piriforme, hipofaringe y otros sitios de la cavidad oral), tumores del sistema reproductor (por ejemplo, vulva, vagina, cérvix uterino, útero, ovario y otros sitios asociados a los órganos genitales femeninos, placenta, pene, próstata, testículo y otros sitios asociados a los órganos genitales masculinos), tumores del tracto respiratorio (por ejemplo cavidad nasal, oído medio, senos accesorios, laringe, tráquea, bronquios y pulmón, tales como cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas), tumores del sistema esquelético (por ejemplo hueso y cartílago articular de extremidades, cartílago articular del hueso y otros sitios), tumores de la piel (por ejemplo melanoma maligno de la piel, cáncer de piel no melanoma, carcinoma de células basales de la piel, carcinoma de células escamosas de la piel, carcinoma de células escamosas de la piel, mesotelioma y sarcoma de Kaposi) y tumores que implican otros tejidos, incluyendo nervio periféricos y sistema nervioso autónomo, tejido conectivo y blando, retroperitoneo y peritoneo, ojo y anejos, tiroides, glándula adrenal y otras glándulas endocrinas y estructuras relacionadas, neoplasmas malignos no especificados y secundarios de los nódulos linfáticos, neoplasma maligno secundario de los sistemas respiratorio y digestivo y neoplasmas malignos secundarios de otros sitios.

En algunas realizaciones, el tumor es melanoma cutáneo o intraocular. En algunas realizaciones, el tumor es melanoma metastásico. En algunas realizaciones, el tumor es cáncer de pulmón de células no pequeñas. En algunas realizaciones, el tumor es cáncer de colon o colorrectal.

En algunas realizaciones, las composiciones resultan útiles en el tratamiento y/o diagnóstico de los tumores neuroectodérmicos (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.667.156). En algunas realizaciones, el tumor neuroectodérmico es el glioma (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.905.027, nº 6.028.174, nº 6.319.891, nº 6.429.187 y 6.870.029 y solicitudes publicadas de patente internacional nº WO03/101475A2, nº WO09/021136A1 y nº WO 2009/140599)

Entre los tipos de glioma para los que las composiciones y métodos de la invención resultan útiles se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, glioblastoma multiforme (WHO grado IV), astrocitomas anaplásicos (WHO grado III), gliomas de grado bajo (WHO grado II), astrocitomas pliocíticos (WHO grado I), oligodendrogliomas, gangliomas,

meningiomas y ependimomas. En algunas realizaciones, el tumor neuroectodérmico se selecciona de entre el grupo que consiste de meduloblastomas, neuroblastomas, feocromocitomas, melanomas, tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos, carcinoma de células pequeñas del pulmón, sarcoma de Ewin y tumores metastásicos en el cerebro.

5 En determinadas realizaciones de la presente invención, se utilizan composiciones en el tratamiento y/o diagnóstico de los sarcomas. En algunas realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención se utilizan en el tratamiento y/o diagnóstico de cáncer de vejiga, cáncer de mama, linfoma crónico, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de endometrio, linfoma no de Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer ovárico, 10 cáncer pancreático y cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el sarcoma se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer de próstata o cáncer de mama (ver, por ejemplo, las solicitudes publicadas de patente internacional n° WO03/101474A1, n° WO03/10475A2 y n° WO 2009/1405999)

15 En algunas realizaciones, el sarcoma es cáncer pancreático.

En determinadas realizaciones de la presente invención, las composiciones y métodos resultan útiles en el tratamiento y/o diagnóstico de los trastornos mieloproliferativos (por ejemplo tumores de origen mieloide) y/o trastornos linfoproliferativos (por ejemplo tumores de origen linfoide) (ver, por ejemplo, las solicitudes publicadas de 20 patente internacional n° WO05/099774).

Entre los tipos de trastornos mieloproliferativos para los que las composiciones y métodos de la presente invención resultan útiles se incluyen, aunque sin limitación, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide agnogénica (MMA) (también denominada mielofibrosis idiopática (MFI)) y leucemia mielógena crónica (LMC). 25

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se utilizan para tratar y/o diagnosticar un trastorno linfoproliferativo. En algunas realizaciones, el trastorno linfoproliferativo es un linfoma no de Hodgkin. En algunas realizaciones, el trastorno linfoproliferativo es un neoplasma de células B, tal como, por ejemplo, una leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras o un neoplasma de células B maduras. Entre los tipos no limitativos de neoplasmas de células B maduras se incluyen la leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células B de la zona marginal esplénica, leucemia de células pilosas, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de las células del manto, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal nodal, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de Buritt, plasmacitoma y mieloma de células plasmáticas. 30

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se utilizan para tratar un neoplasma de células T. Entre los tipos no limitativos de neoplasmas de células T se incluyen la leucemia prolinfocítica de células T, la leucemia linfocítica granular grande de células T, la leucemia de células NK, el linfoma de células NK/T, micosis fungoide, linfoma de células grandes anaplásicas cutáneo primario, linfoma de células T de tipo paniculitis subcutáneo, linfoma de células T intestinal de tipo enteropatía, linfoma de células T gamma-delta hepatoesplénico, linfoma de células T angioinmunoblástico, linfoma de células T periféricas, linfoma de células grandes anaplásico linfoma de células T adultas. 35

Los tumores que pueden tratarse utilizando composiciones de la presente invención pueden ser refractarios a tratamiento con otros quimioterapéuticos. El término "refractario", utilizado en la presente memoria en referencia a un tumor se refiere a que el tumor (y/o metástasis del mismo), tras el tratamiento con por lo menos un quimioterapéutico diferente de una composición de la invención, muestra una respuesta antiproliferativa nula o sólo débil (es decir, una inhibición nula o sólo débil del crecimiento tumoral) tras el tratamiento con dicho agente quimioterapéutico; es decir, un tumor que no puede ser tratado en absoluto o sólo con resultados insatisfactorios con otros quimioterapéuticos (preferentemente convencionales). La presente invención, en la que se menciona el tratamiento de tumores refractarios y similares, debe entenderse que comprende no sólo (i) tumores en los que uno o más quimioterapéuticos ya han fracasado durante el tratamiento del paciente sino también (ii) tumores que puede demostrarse que son refractarios a otros medios, por ejemplo la biopsia y el cultivo en presencia de quimioterapéuticos. 45

50 2. Contextos antiangiogénicos

Se ha demostrado que la clorotoxina posee propiedades antiangiogénicas. Ver, por ejemplo, la solicitud publicada de patente internacional WO2009/117018. 55

En determinadas realizaciones, se utilizan las composiciones y métodos de la presente invención para tratar, diagnosticar y/o aliviar una enfermedad o condición tal como, por ejemplo, cáncer (incluyendo cáncer metastásico, tal como se ha indicado anteriormente), neovascularización ocular (tal como degeneración macular), enfermedades inflamatorias (tal como artritis), etc. En algunas realizaciones, la condición o enfermedad se caracteriza por la neovascularización coroidal. Entre los ejemplos de dichas condiciones o enfermedades se incluyen, aunque sin 60

limitarse a ellas, degeneración macular (incluyendo la degeneración macular húmeda, la degeneración macular asociada a la edad, etc.), miopía, traumatismos oculares, pseudoxantoma elástico y combinaciones de los mismos.

5 La degeneración macular es la causa principal de pérdida de la visión y ceguera en estadounidenses de 65 años o más de edad. La degeneración macular típicamente se produce en la forma relacionada con la edad (con frecuencia denominada DMAE), aunque también se produce la degeneración macular juvenil. En la DMAE, la mácula (la parte de la retina que es responsable de la visión central, más aguda) degenera. La degeneración macular típicamente se diagnostica como seca (no neovascular) y húmeda (neovascular).

10 En la degeneración macular seca, se empiezan a acumular puntos amarillentos conocidos como drusas a partir de depósitos o residuos procedentes de tejido en deterioro de principalmente el área de la mácula. La visión central se pierde habitualmente de manera gradual y no la pérdida no es tan severa como en la degeneración macular húmeda.

15 La degeneración macular húmeda, tal como sugiere la denominación "neovascular", se caracteriza por el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos de manera aberrante, por ejemplo sobre la mácula. Dichos nuevos vasos sanguíneos pueden crecer debajo de la retina, con fuga de sangre y líquido. Dichas fugas causan daños permanentes en las células retinianas fotosensibles, que mueren y crean puntos ciegos en la visión central. La degeneración macular húmeda puede clasificarse adicionalmente en dos categorías. En la forma oculta de la degeneración macular
20 húmeda, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la retina no es tan pronunciado y las fugas son menos evidentes, resultando típicamente en una pérdida menos severa de visión. En la forma clásica de degeneración macular húmeda, el crecimiento de vasos sanguíneos y la cicatrización presentan un contorno delineado muy claro que es observable bajo la retina. La degeneración macular húmeda clásica también se conoce como neovascularización coroidal clásica y habitualmente resulta en una pérdida de visión más severa.

25 Dado el papel de la angiogénesis en la degeneración macular húmeda, que comprende muchos casos de DMAE, las composiciones y métodos de la invención pueden resultar útiles en el tratamiento, diagnóstico y/o mejora de dichos trastornos. Las terapias actuales de la degeneración macular húmeda implican inhibidores de angiogénesis tales como Lucentis™, Macugen™ y/o Visudyne™, opcionalmente combinados con terapia fotodinámica (TFD) para dirigir
30 los fármacos a células específicas. La fotocoagulación, en la que se utiliza un haz láser de alta energía para crear pequeñas quemaduras en áreas de la retina con vasos sanguíneos anormales, también se utiliza para tratar la degeneración macular húmeda.

35 En algunas realizaciones, los conjugados de clorotoxina (o una composición farmacéutica de los mismos) se administran en el sujeto que sufre de degeneración macular húmeda y/o degeneración macular relacionada con la edad. Los sujetos que sufren de degeneración macular húmeda pueden sufrir de la forma oculta o la forma clásica. En algunas realizaciones, los conjugados de clorotoxina provocan la regresión de la neovascularización existente. En algunas realizaciones, los conjugados de clorotoxina evitan el brote de nuevos vasos. En determinadas realizaciones, los conjugados de clorotoxina se combinan con otros tratamientos para la degeneración macular
40 húmeda, tales como la fotocoagulación, el tratamiento con otros inhibidores de angiogénesis, la terapia fotodinámica, etc.

45 En algunas realizaciones, los agentes de clorotoxina indicados en la presente memoria se administran en combinación o como parte de un régimen terapéutico con uno o más regímenes terapéuticos recomendados para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición asociado a la angiogénesis. A título de ejemplos, pueden encontrarse regímenes recomendados para el tratamiento del cáncer en el sitio de internet con URL www.cancer.gov, el sitio de internet del National Cancer Institute. Pueden encontrarse regímenes recomendados para el tratamiento de la degeneración macular en el sitio de internet con URL www.mayo.clinic.org/macular-degeneration/treatment.html. Entre los regímenes de tratamiento se incluyen la quimioterapia, la cirugía y/o la terapia
50 de radiación.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: síntesis de polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina

Los polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina con las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1-28 tal como se muestran en las Tablas 1 y 2 pueden sintetizarse utilizando la síntesis peptídica en fase sólida (SPFS). Se tratan perlas sólidas pequeñas porosas con conectores a través de los cuales el polipéptido sintetizado se une covalentemente a las perlas durante la síntesis. En consecuencia, los polipéptidos nacientes son inmovilizados sobre la fase sólida y resultan retenidos durante las etapas de lavado.
60

La repetición de los ciclos de acoplamiento y desprotección se utiliza para generar polipéptidos con las secuencias SEC ID nº 1 a 28 en cada ciclo de acoplamiento y desprotección; la amina N-terminal libre del péptido o polipéptido unido a la fase sólida se acopla a un única unidad aminoácido que se encuentra protegida en el extremo N-terminal por un grupo protector Fmoc, (9H-(f)luorén-9-il(m)et(o)xi(c)arbonil. Dicha unidad el péptido/polipéptido en crecimiento seguidamente se desprotege bajo condiciones básicas, tal como piperidina al 20% en dimetilformamida para generar
65

una nueva amina N-terminal que pueda unirse a un aminoácido adicional en la siguiente ronda de acoplamiento-desprotección.

Tras completar todos los ciclos según se desea, el polipéptido se escinde de la perla utilizando ácido trifluoroacético.

5 Para generar polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina adicionales, los polipéptidos con las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, 11, 12 y 13 son modificados mediante pegilación en la lisinas según la Tabla 2.

10 Ejemplo 2: ensayos para la actividad de unión de los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina

Se ha demostrado que la clorotoxina se une selectivamente a muchos tipos tumorales diferentes, incluyendo las células de glioma U251 y las células de cáncer de próstata PC3. En el presente Ejemplo, los polipéptidos cloroxina de contenido reducido de lisina generados tal como se indica en el Ejemplo 2 se marcan con biotina y se someten a ensayo para actividad de unión. Cada polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina biotinilado se incuba con células de glioma U251 y separadamente con células de cáncer de próstata PC3 obtenidas a partir de cultivos celulares subconfluentes. Tras la incubación, las células se tiñen con avidina-HRP (por sus siglas en inglés, peroxidasa de rábano picante) utilizando un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. La clorotoxina se utiliza como control positivo de tinción y se utiliza una reacción de incubación sin polipéptido a modo de control negativo de tinción. También puede utilizarse como control negativo de tinción un péptido con una secuencia de aminoácidos que se encuentra mezclada en relación a la de la clorotoxina. La tinción positiva tal como se pone de manifiesto por la presencia de un producto de reacción de color de HRP se utiliza como indicación de la unión al polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina biotinilado.

25 Los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina que muestran unión a células U251 o PC3 seguidamente se someten a ensayo (en forma marcada) en ensayos de unión competitiva en los que se utiliza clorotoxina no marcada como competidor. Se identifican los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina que muestran niveles en disminución de la unión en presencia de cantidades crecientes de clorotoxina.

30 Con el fin de cuantificar el porcentaje de células unidas, se utiliza avidina acoplada a un pigmento fluorescente, tal como FITC o rojo Texas en lugar de avidina-HRP para teñir las células tras la incubación con polipéptidos biotinilados y las células se analizan mediante FACS (por sus siglas en inglés, separación celular activada por fluorescencia).

35 Ejemplo 3: ensayos adicionales de la actividad de unión de los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina

Los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina identificados como de unión en competencia con la clorotoxina a U251 y/o PC3 en las células del Ejemplo 2 se sometieron a ensayos adicionales para la actividad de unión a un rango más amplio de tipos celulares con el fin de obtener un perfil de unión más completo.

45 La Tabla 3 lista las líneas celulares y células de cultivo primario, cualquiera de las cuales o cualquier combinación de las cuales puede someterse a ensayo en ensayos de unión con polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina. Entre las líneas celulares y células de cultivo primario listadas en la Tabla 3 se incluyen líneas celulares tanto de glioma como de no glioma procedentes de ser humano, rata y ratón.

Tabla 3: células primarias y líneas celulares tumorales la unión a las cuales puede someterse a ensayo

Líneas celulares de glioma humano	Otras líneas celulares de glioma
D54-MG	C6 rata
U251-MG	9L rata
CH235	GL2gl ratón
STTG1	Células primarias
U138-MG	Cultivos primarios de rata de astrocitos normales corticales y de médula espinal
U87-MG	Cultivos de glioma primario humano
U373-MG	Cultivos de astrocitos normales humanos
T98G	Cultivos de fibroblastos normales humanos
A172	Células endoteliales vasculares umbilicales humanas
G26	(HUVEC)
Líneas celulares no de glioma	
Neuroblastoma humano SH-SY5Y	Cáncer de mama humano MDA-MB-453
Neuroblastoma humano SH-N-MC	Cáncer de mama humano DY3672
Neuronales humanas HCN-2	Carcinoma de cérvix humano HeLa

Neuroectodérmicas primitivas humanas PFSK-1		Cáncer de mama humano LCC6
Carcinoma de colon humano HT 29		Línea celular neuronal humana HCN-2
Línea celular renal de mono COS-2		Carcinoma de mama humano BT474
Línea celular de fibroblastos de ratón BALBc 3T3		Fibroblastos de piel humanos CCD986Sk
Renal epitelial humana HEK 293		Adenocarcinoma de mama humano SK-BR-3
Línea celular de fibroblastos de ratón NIH 3T3		Cáncer de mama humano MCSF-7
Fibroblastos de pulmón humanos CCD19lu		Adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231
Fibroblastos de pulmón humanos H460		Adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-468
Pulmonares humanas A549		ováricas de hámster chino CHO
Carcinoma de pulmón humano A-427		Melanoma humano SKMEL-31
Cáncer de pulmón humano W-62		Melanoma humano SKMEL-28
Adenocarcinoma de pulmón humano NIH-H1466		Melanoma metastásico humano 3M Malme
Línea celular de pulmón de células no pequeñas humano 1299		Cáncer pancreático humano Panc-1
Carcinoma de colon humano Caco -2		Cáncer pancreático humano PaCa-2
Carcinoma de colon humano HCT116		Carcinoma hepático humano HepG2
Adenocarcinoma colorrectal humano SW948		Carcinoma renal de células claras humanas Caki-1
Cáncer de próstata humano DU 145		Adenocarcinoma de células renales humanas ACHN
Cáncer de próstata humano PC -3		Linfoma humano de Raji
Cáncer de próstata humano LNCaP		Linfoma humano Daudi
Cáncer de mama metastásico humano 2LMP		Leucemia humana MOLT4
		Leucemia promielocítica aguda humana HL60

Ejemplo 4: conjugación de polipéptidos clorotoxina monolisina a paclitaxel

5 Uno o más polipéptidos clorotoxina monolisina sintetizados en el Ejemplo 1 y sometidos a ensayo opcionalmente en los Ejemplos 2 y/o 3 se conjugaron con paclitaxel, que por sí mismo es un agente terapéutico anticáncer insoluble en agua. El paclitaxel es un inhibidor de la mitosis.

10 Los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina se hicieron reaccionar con una entidad éster de paclitaxel-conector carboxi (por ejemplo NHS/EEDQ) en PBS y se incubaron. Se analizaron muestras del producto final purificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y espectrometría de masas (EM) para confirmar que se generaban conjugados de una única especie. Los conjugados resultantes se sometieron a ensayo para solubilidad en agua mediante la determinación de la concentración de saturación y la tasa de solución. Se identificaron los conjugados que eran solubles en agua para el análisis adicional como candidatos a fármaco.

15 Ejemplo 5: conjugación de polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina a gemcitabina

20 Se sintetizaron polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina que no presentaban ningún residuo de lisina en absoluto (ver, por ejemplo, SEC ID nº 2, 5 y 6) tal como se indica en el Ejemplo 1 y se sometieron a ensayo opcionalmente para la unión en los Ejemplos 2 y/o 3. Los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina se conjugaron con gemcitabina (GemzarTM), un análogo de nucleósido, mediante el extremo N-terminal.

Ejemplo 6: ensayo in vitro de unión de conjugados de clorotoxina

25 Los conjugados de clorotoxina de los Ejemplos 4 y 5 pueden someterse a ensayo individualmente para la unión a las líneas celulares tumorales indicadas para los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina, tal como se indica en los Ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 7: ensayo in vitro de citotoxicidad de conjugados de clorotoxina

30 Los conjugados de clorotoxina obtenidos de los Ejemplos 4 y 5 y opcionalmente sometidos a ensayo para unión tal como se indica en el Ejemplo 6 se sometieron a ensayo para citotoxicidad en una o más de las líneas celulares listadas en la Tabla 3. Las células en cultivo se expusieron a conjugados de clorotoxina mediante la incubación en concentraciones diferentes de conjugados de clorotoxina. Tras 1,5 horas de exposición, se midió la viabilidad celular y se representó un gráfico del porcentaje de células viables frente a la concentración molar de conjugado de clorotoxina. A título comparativo, las células se incubaron separadamente con agente citotóxico solo (por ejemplo paclitaxel del Ejemplo 4 o temozolomida del Ejemplo 5) y se representó una curva de dosis-respuesta similar para la viabilidad.

Ejemplo 8: incorporación in vivo de los conjugados de clorotoxina

La incorporación in vivo de los conjugados de clorotoxina de la presente invención puede evaluarse mediante la obtención de imágenes utilizando péptido radiomarcado in situ (marcado con ¹³C, ²H o ¹⁵N, etc.) y/o entidad/fracción radiomarcada, nanopartículas e imágenes de resonancia magnética y/o pigmentos del infrarrojo cercano e imágenes biofotónicas. También pueden utilizarse anticuerpos anti-polipéptido clorotoxina para detectar la incorporación en los tejidos.

Ejemplo 9: actividad biológica de los polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina en la inhibición de la invasión celular

Se sometieron a ensayo polipéptidos clorotoxina de contenido reducido de lisina (o conjugados de los mismos) para la capacidad de inhibir la invasión de las células tumorales utilizando un ensayo de migración trans-pocillo. En este ensayo, se sembraron células tumorales en la cámara superior del trans-pocillo con o sin el polipéptido clorotoxina de contenido reducido de lisina (o conjugados del mismo) y se estimuló la migración de las células con un factor de crecimiento tal como FCVE o PDGF. Tras aproximadamente 24 horas de incubación en medio de cultivo celular, las células no migrantes que quedaban en la cara superior del filtro trans-pocillos se eliminaron y las células migradas en la cara inferior se tiñeron para la visualización. Se contaron las células que habían migrado a modo de índice de invasión. Las variantes de clorotoxina modificada que presentaban una actividad biológica similar a la clorotoxina se consideró que conservaban actividad funcional.

Ejemplo 10: conjugados de clorotoxina en un modelo in vivo de tumor de cáncer de mama

Se sometió a ensayo la actividad terapéutica de los conjugados de clorotoxina en un modelo in vivo de cáncer de mama. En el presente ejemplo, se utilizó un modelo de tumor en el ratón creado mediante la xenoinjertación de células de cáncer de mama MDA-MB-468 en ratones receptores a fin de someter a ensayo los efectos de los conjugados de paclitaxel-clorotoxina generados en los Ejemplos 4 sobre el crecimiento tumoral.

Los ratones portadores de tumores en el flanco recibieron una inyección intravenosa de una dosis de paclitaxel de 3,7 mg/kg tres veces a la semana durante un total de 8 dosis. La concentración de conjugado utilizada en estos experimentos era "sub-terapéutica" en el aspecto de que el mismo régimen de administración con paclitaxel no conjugado no resultaba suficiente para presentar un efecto terapéutico. Un grupo de ratones que recibió una inyección de solución salina sola sirvió de control. Otro grupo de ratones recibió una inyección de paclitaxel a una dosis de 3,7 mg/kg. Se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral utilizando calibradores para medir la longitud y anchura del tumor durante y después del intervalo de tratamiento. El crecimiento tumoral respecto al tiempo se representa en un gráfico como porcentaje del tamaño del tumor original frente al tiempo.

Otras realizaciones

Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la consideración de la especificación o la práctica de la invención dada a conocer en la presente memoria. Se pretende que la especificación y los ejemplos se consideren meramente ejemplares, estando indicado el alcance real de la invención por las reivindicaciones, posteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TransMolecular Inc. SENTISSI, Abdellah JACOBY, Douglas B

<120> POLIPÉPTIDOS CLOROTOXINA Y CONJUGADOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 2006636-0156

<150> US 61/301,615

<151> 2010-02-04

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Leiurus quinquestratus

<400> 1

ES 2 638 871 T3

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

5 <210> 2
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 2

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

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

15 Arg
 <210> 3
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 3

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

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

Cys Arg

30 <210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 4

ES 2 638 871 T3

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

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

Arg Lys

5 <210> 5
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 5

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 Ala Cys Tyr Gly Pro Gln
 20 25 30

Cys Leu Cys Arg
 35

15 <210> 6
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 6

25 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 Arg Cys Tyr Gly Pro Gln
 20 25 30

Cys Leu Cys Arg
 35

30 <210> 7
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 7

ES 2 638 871 T3

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

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

Gln Cys Leu Cys Arg
 35

5 <210> 8
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 8

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

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

Gln Cys Leu Cys Arg
 35

15 <210> 9
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 9

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 Ala Cys Tyr Gly Pro Gln
 20 25 30

Cys Leu Cys Arg Lys
 35

25 <210> 10
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 35 <400> 10

ES 2 638 871 T3

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 Arg Cys Tyr Gly Pro Gln
 20 25 30

Cys Leu Cys Arg Lys
 35

5 <210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 11

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

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

Leu Cys Arg
 35

15 <210> 12
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 12

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

Leu Cys Arg
 35

25 <210> 13
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 13

ES 2 638 871 T3

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 Cys Tyr Gly Pro Gln Cys
 20 25 30

Leu Cys Arg
 35

5 <210> 14
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 14

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

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

Cys Arg

15 <210> 15
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 15

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

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

Cys Arg

30 <210> 16
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 16

ES 2 638 871 T3

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 Gly Arg Gly Cys Tyr Gly Pro Gln Cys Leu
 20 25 30

Cys Arg

5 <210> 17
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 17

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

15 <210> 18
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 18

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

Cys Leu Cys Arg
 35

25 <210> 19
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 19

ES 2 638 871 T3

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

Cys Leu Cys Arg
 35

5 <210> 20
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 20

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

15 <210> 21
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 21

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

Cys Leu Cys Arg
 35

25 <210> 22
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 22

ES 2 638 871 T3

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

Cys Leu Cys Arg
 35

5 <210> 23
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 23

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

Cys Leu Cys Arg
 35

15 <210> 24
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 24

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

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

25 Leu Cys Arg
 35

30 <210> 25
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 25

ES 2 638 871 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 Gly Arg Gly Ala Cys Tyr Gly Pro Gln Cys
 20 25 30

Leu Cys Arg
 35

5 <210> 26
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 26

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 Cys Tyr Gly Pro Gln Cys
 20 25 30

Leu Cys Arg
 35

15 <210> 27
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 27

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

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

Gln Cys Leu Cys Arg
 35

25 <210> 28
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 28

ES 2 638 871 T3

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 Lys
35

5 <210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 29

15 Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido clorotoxina que no presenta más de una lisina, en el que el polipéptido clorotoxina presenta una identidad de secuencia global de por lo menos 85% respecto a la SEC ID nº y en el que el polipéptido clorotoxina se une selectivamente a una célula tumoral.
- 10 2. Polipéptido clorotoxina según la reivindicación 1, que comprende una lisina en una posición correspondiente a una posición en la que se encuentra presente una lisina en la clorotoxina, opcionalmente en la que la lisina se encuentra en una posición correspondiente a una posición seleccionada de entre el grupo que consiste de la posición 15 de la SEC ID nº 1, la posición 23 de la SEC ID nº 1 y la posición 27 de la SEC ID nº 1.
- 15 3. Polipéptido clorotoxina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos uno de los residuos aminoácidos correspondiente a las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 no es una lisina, opcionalmente en el que por lo menos un residuo aminoácido correspondiente a las posiciones 15, 23 y 27 de la SEC ID nº 1 es una alanina o arginina.
- 20 4. Polipéptido clorotoxina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que no presenta por lo menos un aminoácido correspondiente a la posición 15, 23 o 27 de la SEC ID nº 1.
5. Polipéptido clorotoxina según la reivindicación 1, que no presenta residuos de lisina.
- 25 6. Polipéptido clorotoxina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido clorotoxina comprende por lo menos una modificación covalente, opcionalmente en el que la modificación covalente comprende por lo menos uno de los siguientes: un PEG (polietilenglicol), un PEG diácido tiol-ácido, maleimida-ácido, un espaciador dipéptido, una amida, un grupo dimetilo, un grupo trimetilo, un grupo alquilo, un grupo butilo, un grupo propilo y un grupo etilo.
- 30 7. Conjugado que comprende por lo menos un polipéptido clorotoxina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores asociado a por lo menos una fracción terapéutica, en el que la fracción terapéutica se asocia covalentemente al polipéptido clorotoxina mediante una lisina única en caso de hallarse presente o mediante el extremo N-terminal del polipéptido clorotoxina.
- 35 8. Conjugado según la reivindicación 7, en el que el polipéptido clorotoxina y la fracción terapéutica se asocian directamente de manera covalente.
- 40 9. Conjugado según la reivindicación 7 o 8, en el que la fracción terapéutica comprende un agente anticáncer, opcionalmente:
- 45 a) en el que el agente anticáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de: BCNU, cisplatino, gemcitabina, hidroxurea, paclitaxel, temozolomida, topotecán, fluorouracilo, vincristina, vinblastina, procarbazona, decarbazina, altretamina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina fosfato, cladribina, pentostatina, citarabina, azacitidina, etopósido, tenipósido, irinotecán, docetaxel, doxorubicina, daunorubicina, dactinomicina, idarrubicina, plicamicina, mitomicina, bleomisina, tamoxifeno, flutamida, leuprólido, goserelina, aminoglutimida, anastrozol, amsacrina, asparaginasa, mitoxantrona, mitotano y amifostina, o
- 50 b) el agente anticáncer es un elemento del grupo que consiste de agentes anticáncer que muestran una pobre selectividad/especificidad para las células de cáncer; agentes anticáncer que muestran una pobre incorporación por las células de cáncer; agentes anticáncer que muestran una pobre retención en las células de cáncer; agentes anticáncer que muestran una pobre solubilidad en agua; agentes anticáncer que experimentan una inactivación prematura en las células de cáncer; agentes anticáncer que experimentan una activación alterada en las células de cáncer; agentes anticáncer que experimentan una degradación celular extensiva y agentes anticáncer asociados a resistencia farmacológica.
- 55 10. Conjugado según la reivindicación 9, en el que el agente anticáncer:
- 60 a) muestra una solubilidad en agua pobre, y/o
b) es un taxano, seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste de paclitaxel, docetaxel y una combinación de los mismos.
11. Conjugado según la reivindicación 7 o 8, en el que la fracción terapéutica es:
- 65 a) un elemento del grupo que consiste de radioisótopos, enzimas, enzimas activadores de profármaco, radiosensibilizadores, ARNs interfirientes, superantígenos, agentes antiangiogénicos, agentes

- alquilantes, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, alcaloides vegetales, antibióticos intercalantes, inhibidores de aromataasa, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas y antiandrógenos, o
- 5 b) una molécula de ácidos nucleicos seleccionada de entre un ADN, un ARN enzimático, un híbrido ARN:ADN, un ADN tríplex, un ARNcs, un ARNdc, un ARNt, un ARNm, un ARNr o cualquier combinación de los mismos.
12. Conjugado según la reivindicación 7, en el que el polipéptido clorotoxina se une covalentemente a una fracción que comprende un polímero, opcionalmente en el que el polímero es polietilenglicol, opcionalmente unido mediante el extremo amino-terminal del polipéptido clorotoxina.
- 10 13. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de por lo menos un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, o una sal fisiológicamente tolerable del mismo y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 14. Composición que comprende el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 o la composición farmacéutica según la reivindicación 13 para la utilización en un método de tratamiento de: (a) un individuo que presenta o que se sospecha que presenta un tumor, de manera que el conjugado se une específicamente al tumor, o (b) un individuo que presenta o que se sospecha que presenta una enfermedad o condición caracterizada por angiogénesis aberrante, de manera que el conjugado de clorotoxina reduce el grado de angiogénesis.
- 20 15. Composición para la utilización según la reivindicación 14, en la que el tumor es un tumor neuroectodérmico, opcionalmente seleccionado de entre el grupo que consiste de meduloblastomas, neuroblastomas, feocromocitomas, melanomas, tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos, carcinoma de células pequeñas de pulmón, sarcoma de Ewing, tumores metastásicos del cerebro y glioma, opcionalmente en la que el glioma se selecciona de entre el grupo que consiste de glioblastoma multiforme (WHO grado IV), astrocitomas anaplásicos (WHO grado III), gliomas de grado bajo (WHO grado II), astrocitomas pliocíticos (WHO grado I), oligodendrogliomas, gangliomas, meningiomas y ependimomas.
- 25 30 16. Composición para la utilización según la reivindicación 14, en la que el tumor se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma cutáneo o intraocular, un tumor metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer colorrectal y cáncer pancreático.
- 35 17. Composición para la utilización según la reivindicación 16, en el que el tumor metastásico es melanoma metastásico.
- 40 18. Composición para la utilización según la reivindicación 14, en la que el conjugado de clorotoxina evita la formación de neovascularización o causa la regresión de la neovascularización existente.
- 45 19. Composición para la utilización según la reivindicación 14 o 18, en la que la enfermedad o condición es la degeneración macular o una enfermedad inflamatoria opcionalmente en la que la enfermedad inflamatoria es la artritis reumatoide.
- 50 20. Conjugado que comprende por lo menos un polipéptido clorotoxina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido clorotoxina se asocia covalentemente a por lo menos una fracción detectable o fracción de transporte mediante la lisina única en caso de hallarse presente o mediante el extremo N-terminal del polipéptido clorotoxina.
- 55 21. Conjugado según la reivindicación 20, en el que el polipéptido clorotoxina y la fracción detectable o la fracción de transporte se asocian directamente de manera covalente.
- 60 22. Conjugado según la reivindicación 20 o 21, en el que la fracción detectable se selecciona de entre una lista que consiste de:
ligandos, radionucleidos, pigmentos fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes bioluminiscentes, puntos cuánticos, micropartículas, nanopartículas metálicas, nanoagregados, iones metálicos paramagnéticos, enzimas, marcajes colorimétricos, biotina, dioxigenina y haptenos, opcionalmente en el que:
- 65 a) el radionucleido se selecciona de entre el grupo que consiste de yodo-131 (^{131}I), yodo 125 (^{125}I), bismuto-212 (^{212}Bi), bismuto-213 (^{213}Bi), astato-221 (^{221}At), cobre-67 (^{67}Cu), cobre-64 (^{64}Cu), renio-186 (^{186}Re), renio-188 (^{188}Re), fósforo-32 (^{32}P), samario-153 (^{153}Sm), lutecio-177 (^{177}Lu), tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), galio-67 (^{67}Ga), indio-111 (^{111}In) y talio-201 (^{201}Tl), o

b) el metal paramagnético se selecciona de entre un grupo que consiste de gadolinio III (Gd^{3+}), cromo III (Cr^{3+}), disprosio III (Dy^{3+}), hierro III (Fe^{3+}), manganeso II (Mn^{2+}) e iterbio III (Yb^{3+}).

- 5 23. Conjugado según la reivindicación 20 o 21, en el que la fracción de transporte comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
24. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 para la utilización en un método de detección de cáncer en un sujeto.
- 10 25. Conjugado para la utilización según la reivindicación 24, en el que el conjugado está destinado a la detección de un tumor durante cirugía.