



Instituto de Biología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INVENCION

PATENTE

PROPIEDAD

LICENCIA



Guía del Instituto de Biología de la UNAM para la
redacción y registro de patentes



M. en Admón. Mario Trejo Loyo
Secretario Técnico de Gestión y
Transferencia de Tecnología,
Secretaría de Vinculación
Instituto de Biotecnología/UNAM
mtrejo@ibt.unam.mx

ÍNDICE

Introducción al sistema de protección de la propiedad intelectual e industrial	4
¿Qué tanto se patenta en México y qué tanto lo hace la UNAM?	5
¿Qué es una patente, qué derechos y compromisos involucra?	9
¿Qué es una invención y qué no se considera como tal?	10
¿Qué categorías de invenciones patentables existen?	12
¿Qué requisitos debe cumplir una invención para ser patentable?	14
Excepciones a la patentabilidad	16
¿Qué invenciones biotecnológicas son patentables y cuáles no lo son?	17
¿Qué es el <i>Estado de la Técnica</i> y para qué me sirve realizar una búsqueda?	19
¿Cómo, quién y cuándo realizar una búsqueda del <i>Estado de la Técnica</i> ?	20
¿Cómo analizar un documento de patente que forma parte del <i>Estado de la Técnica</i> ?	22
¿Quiénes califican como inventores?	22
¿Qué derechos y obligaciones adquiere la UNAM?	23
¿Qué derechos y obligaciones adquieren los inventores?	24
¿Qué secciones tiene una solicitud de patente?	26
¿Cómo es el procedimiento de la oficina de patentes y cuánto tiempo se lleva?	29
¿Qué son las solicitudes internacionales de patente?	30
¿Cuánto cuesta patentar y quién paga en el caso del IBt?	32
¿Quién se encarga en el IBt, de la redacción y gestión de la solicitud de patente?	33
Confidencialidad	33
Como inventores ¿qué pasos debemos tomar y cuándo?	34
¿Qué información debemos proporcionar para la redacción de la patente?	36
¿Qué es mejor: la publicación o la patente?	36
¿De qué sirve tener una patente?	36
¿Por qué debe patentar la UNAM siendo pública?	37
¿Qué es la explotación comercial de las patentes?	38
¿Vale la pena patentar toda invención que cumpla los requisitos?	39
REFERENCIAS	40
Lecturas sugeridas	41
Anexos	43

Introducción al sistema de la propiedad intelectual e industrial

Comenzaremos por decir que existe un conjunto de sistemas de protección de los derechos de propiedad intelectual. Por un lado, está el sistema de protección de los derechos de autor y conexos, que protegen las obras literarias (incluidas libros y manuales técnicos) y artísticas (incluidas las musicales, cine, etc.). Está también un sistema que protege los derechos de un obtentor de una variedad vegetal que, como su nombre lo sugiere, protege esencialmente variantes de plantas (por ejemplo, de ornato). Finalmente, existe un sistema de la protección de la propiedad industrial (que como su nombre lo sugiere, la materia de su protección está más relacionada con el quehacer de la industria), sobre el cual tratará más a fondo la presente guía.



¿Qué tanto se patenta en México y qué tanto lo hace la UNAM?

El sistema de protección de la propiedad industrial abarca diversas figuras legales de protección:

- **Marcas, Marcas Colectivas y Avisos Comerciales** (estos primeros 3 están más relacionados con el nombre y logo de las empresas y sus productos, así como los temas centrales de sus campañas de publicidad);
- **Secretos industriales** (cuya protección no se basa en su registro, sino en las acciones que el dueño tome para prevenir su divulgación);
- **Modelos de Utilidad** (que protegen principalmente la forma-función tridimensional de los productos);
- **Diseños Industriales** (que típicamente protegen diseños planos como las etiquetas de los productos),
- **Denominaciones de Origen** (que son propiedad del Estado y se limitan a zonas geográficas y se designan a productos cuya calidad depende en cierta medida de características climáticas, de suelo y tradiciones de la región que las ostenta),
- **Circuitos impresos** (que tienen una aplicación más bien en la electrónica) y
- **Patentes** (que protegen invenciones y que es la materia que se desarrollará con mayor detalle en la presente guía).

A diferencia de lo que sucede en otros países, en México -tal vez por el proteccionismo en el que vivió por décadas durante el siglo pasado- no se tiene una cultura fuertemente arraigada de la protección de los derechos de propiedad intelectual, particularmente de las invenciones por patente. En este sentido, podemos ver las cifras que reporta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) en su documento "IMPI en Cifras (2017)" [2], en el que resalta que **en México se registraron 18,071 solicitudes de patente en 2015 (cifra que ha crecido paulatinamente; en 1993 se registraron 8,212, es decir, un crecimiento del 120 % en 22 años)**. En contraste, en los Estados Unidos, según reporta su Oficina de Patentes y Marcas en el documento "U.S. Patent Statistics Chart Calendar Years 1963 – 2015" [16], el número de solicitudes de patentes anuales ha pasado de 174,743 a 589,410, es decir, un crecimiento del 237 % en el mismo período. Es, además, evidente que el número de solicitudes en México representa apenas un 3 % de las registradas en Estados Unidos (al 2015).

Además, en el mismo periodo analizado, mientras que en los Estados Unidos, las solicitudes de patente que son presentadas por personas (físicas y morales) nacionales de dicho país, fluctúa entre un 48.9 % y 51.2 %; en México las solicitudes de patente que son presentadas por personas (físicas y morales) nacionales de México, fluctúa históricamente **apenas entre el 3.3 % y el 8.4 % de las solicitudes totales de patente**. Es decir, esto es un reflejo de la dependencia de nuestro país por la tecnología extranjera. Ese 3.3 a 8.4 % de las solicitudes de patente registradas en México que corresponde a solicitantes mexicanos, equivale a una cantidad anual de solicitudes que oscila entre las 386 y las 1,364.

Solo 3.3-8.4% de las patentes mexicanas son de mexicanos

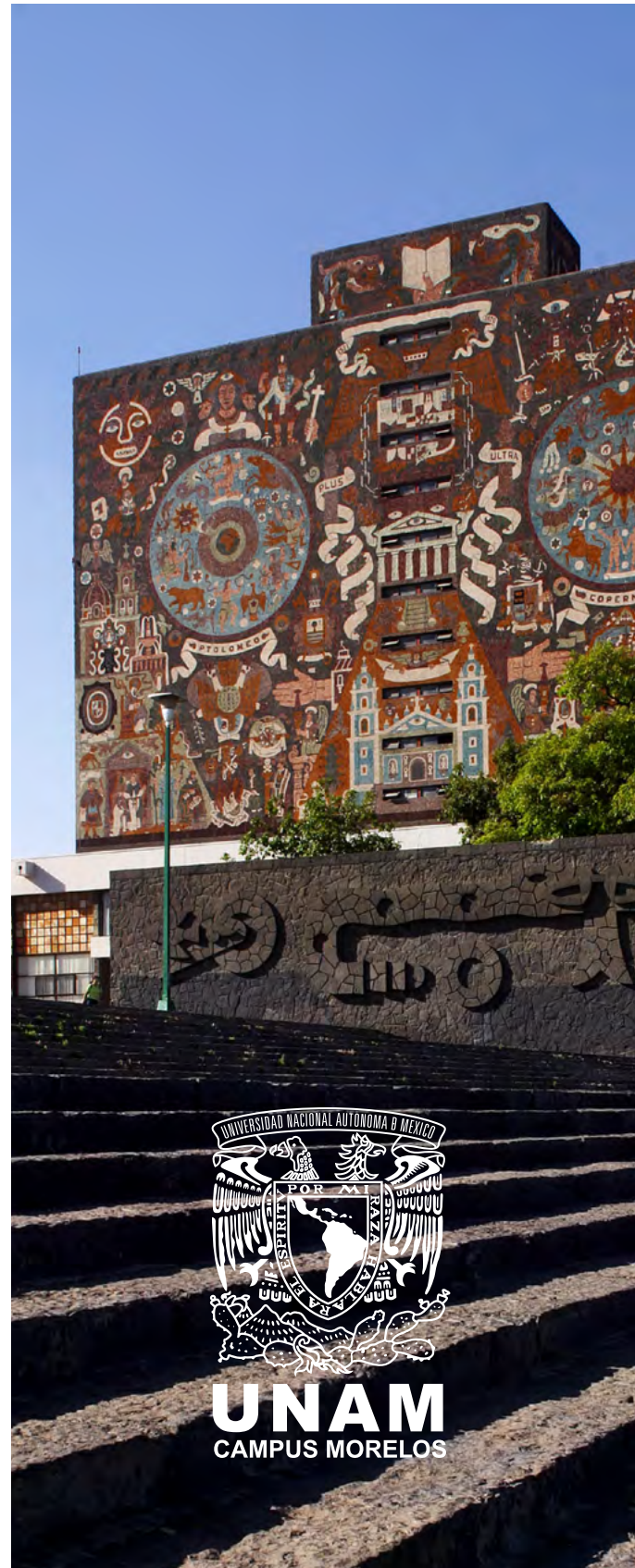
Mientras que 50% de las patentes estadounidenses son de estadounidenses

Los países que mayor número de sus nacionales solicitan patentes en México (en 2015) fueron: los Estados Unidos (48 %) seguido por México (7.5 %), Alemania (7 %), Japón (5.7 %), Suiza (5 %), además de Francia, Reino Unido, España e Italia con menores porcentajes.

Según el IMPI, los principales titulares de las patentes que otorgó en 2015 incluyen nombres de compañías como las estadounidenses: The Procter & Gamble Company (con 149 Patentes), Halliburton Energy Services, Inc. (con 95), Microsoft Technology Licensing, LLC (con 66), Genentech, Inc (con 32), Dow Agrosiences LLC. (con 26), entre las casi 160 empresas estadounidenses enlistadas; las alemanas BASF SE (con 81), Bayer Intellectual Property GMBH (con 55), Sanofi-Aventis Deutschland GMBH (con 22) entre las 32 empresas teutonas enlistadas; las japonesas Nissan Motor Co., LTD (con 65), Sony Corporation (con 61), de entre 22 empresas de ese país enlistadas; y las francesas Saint-Gobain Glass France (con 28) y Sanofi (con 19), de entre 20 empresas galas enlistadas.

Entre los principales titulares de patentes de organizaciones mexicanas destacan el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (con 25 Patentes), seguido por la Universidad Nacional Autónoma de México (con 24), el ITESM (con 17), de entre 14 organizaciones enlistadas. Resalta el hecho de que, en el caso de México, a diferencia de los demás países, **9 de las 14 entidades enlistadas son instituciones académicas** (es decir un 64%) y uno es una persona física. Esto es, solo hay 4 empresas mexicanas enlistadas entre los principales titulares de patentes otorgadas en 2015 por el IMPI.

La **UNAM** es la Institución de Educación Superior en México con más patentes registradas, con 146 patentes otorgadas y 383 solicitudes en el período 2006-2016, según la Coordinación de Innovación y Desarrollo de esta Casa de Estudios (Boletín UNAM DGCS-513), [15].



El Instituto de Biotecnología (IBt) es la entidad académica que más contribuye con las patentes de la UNAM. En el mismo período, le han sido otorgadas 25 patentes en México, y registró 40 solicitudes. Adicionalmente, en el extranjero le han otorgado 29 patentes y ha solicitado 88 y además ha presentado 11 solicitudes internacionales (PCT). Ver el **anexo 1**, donde se reproduce un resumen de la ponencia titulada “Análisis histórico de la actividad de patentamiento del Instituto de Biotecnología de la UNAM” [10]. Se sugiere revisar los artículos de M. Trejo (2015) [7], M. Trejo y M. Patiño (2016) [11], M. Trejo y M. Patiño (2017) [12], y M. Trejo y M. Patiño (2018) [14] que se presentan como anexos 2, 3, 4 y 5.

En contraste, en un estudio elaborado por la Intellectual Property Owners Organization de los Estados Unidos, sobre las principales 300 organizaciones titulares

de patentes estadounidenses en 2015 [3], incluye solo a 11 instituciones académicas (Universidades e Institutos) incluyendo a el Electronics and Telecommunications Research Institute (con 800 Patentes, lugar 49), a la Universidad de California (con 489, lugar 82), a la Industrial Technology Research Institute, Taiwan (con 423, lugar 89), el Massachusetts Institute of Technology (con 278, lugar 122), a la Universidad de Stanford (con 162, lugar 162), y a la Universidad de Texas (con 191, lugar 174). Los primeros 10 lugares los ocupan las empresas (en orden descendente): International Business Machines, Corp.; Samsung Electronics Co., Ltd.; Canon K.K.; Qualcomm, Inc.; Google, Inc.; Toshiba Corp.; General Electric Co.; Intel Corp.; Microsoft Corp.; y Sony Corp. Entre las 10, acumulan la friolera de 31,049 patentes otorgadas tan solo en 2015 en los Estados Unidos.

¿Qué es **una patente**, qué derechos y compromisos involucra?

Una patente es un título de propiedad sobre un bien intangible, que es una invención (tecnología).

Es el equivalente a la escritura de una casa o la factura de un automóvil (que son bienes tangibles) pero para un invento o tecnología (bien intangible). **Una patente es otorgada por la autoridad designada por el Estado** (el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, IMPI, es la autoridad correspondiente por el Estado Mexicano). Cada Estado (a través de su autoridad designada) tiene la facultad de evaluar una solicitud de patente que le es presentada y determinar, conforme a su legislación aplicable, si otorga o no la patente correspondiente, y si lo hace, qué alcances y limitaciones técnicas y legales le confiere a la patente que otorga.

Una patente da a su titular el derecho a impedir que terceros exploten su invención, en el país donde se otorga.

Una patente puede también ser vista como un compromiso entre el estado otorgante y el titular de la patente: el Estado le otorga el derecho de impedir a terceros el poder producir industrialmente la invención protegida por la patente (así como de importar a y comercializar en dicho Estado, la invención o productos producidos por medio de, o que involucran, la

misma). A cambio, el inventor y el titular tienen que divulgar (hacer del conocimiento público) cómo se obtuvo la invención, en qué consiste y cuál es la mejor forma de producirla o utilizarla y qué problema técnico resuelve. Esto con el fin de que dicha invención se pueda constituir en la base para nuevas invenciones por parte de otros inventores. Por este motivo, tras presentarse una solicitud de patente ante la oficina de patentes de un Estado, el contenido de la solicitud es publicado (al cumplirse los 18 meses) en la gaceta de patentes de dicho Estado.

El derecho de exclusividad otorgado al titular de la patente por el Estado no debe interpretarse como un permiso para explotar la invención protegida por la patente, sino sólo como el derecho de impedir legalmente a terceros de explotarla. Por ejemplo, si se trata de un nuevo fármaco, el obtener la patente no le da al titular el permiso de producirlo y comercializarlo, ese permiso lo debe otorgar la autoridad de salud correspondiente (la COFEPRIS, en el caso de México, previo cumplimiento de todos los requisitos técnicos y legales que dicha instancia exige).

En el ámbito internacional, muchas legislaciones (de los distintos Estados) exigen que el titular lleve a cabo efectivamente la explotación de su invención patentada (ya sea por sí mismo o mediante el otorgamiento de licencias o autorizaciones a terceros), cosa que, de no hacerse, puede ser causa de que la patente sea anulada.



¿Qué es una invención y qué no se considera como tal?

Una invención, según lo define la Ley de la Propiedad Industrial (LPI en el caso de México) es toda creación humana que permite transformar la materia o energía para su aprovechamiento y con el fin de satisfacer una necesidad o solucionar un problema técnico.

No obstante, en la LPI (Art. 19) no son consideradas como invenciones:

- Principios teóricos o científicos
- Descubrimientos. Revelar algo que ya existe en la naturaleza
- Esquemas, planes, reglas, métodos para actos mentales, juegos o negocios y métodos matemáticos
- Programas de cómputo. Formas de presentación de información (éstos, en México se protegen por derecho de autor, aunque en otros países como los EUA sí son sujetos de patente)
- Métodos de tratamiento quirúrgico y diagnóstico *in vivo* (igualmente, en otros países como los EUA, sí son patentables). Los métodos de diagnóstico *ex vivo* o *in vitro* sí son patentables. La no patentabilidad de los métodos no debiera afectar la patentabilidad de los equipos y sustancias necesarios para ponerlos en práctica.
- La yuxtaposición de invenciones (no incluye las sinergias, que sí pueden ser patentadas).



¿Qué categorías de invenciones patentables existen?

Existen esencialmente 3 categorías de invenciones: de productos, de procesos (o métodos), y de nuevos usos (de productos o procesos previamente conocidos). Los productos pueden ser sustancias puras, composiciones de sustancias, aparatos o dispositivos, elementos de alguna maquinaria, objetos, etc. Estos deben estar caracterizados según las características intrínsecas del producto, independientemente de cómo sea producido. Los procesos o métodos, por otra parte, describen un conjunto de acciones necesarias (o pasos) para transformar la materia y/o energía y deben estar caracterizados precisamente en los detalles de cada paso del proceso o método. Los nuevos usos, por su lado, se caracterizan por utilizar productos o procesos ya conocidos, para resolver problemas diferentes a los que con anterioridad se conocía que resolvían.

PRODUCTOS

Algunos ejemplos de PRODUCTOS incluyen genes aislados de algún organismo, enzimas, proteínas de membrana, hibridomas y otras líneas celulares, cepas de microorganismos modificadas genéticamente, metabolitos, variantes de antibióticos, polisacáridos y biopolímeros en general, vacunas, péptidos con actividades fisiológicas en mamíferos, proteínas terapéuticas, kits diagnósticos, nanopartículas, nuevos fármacos, etc.

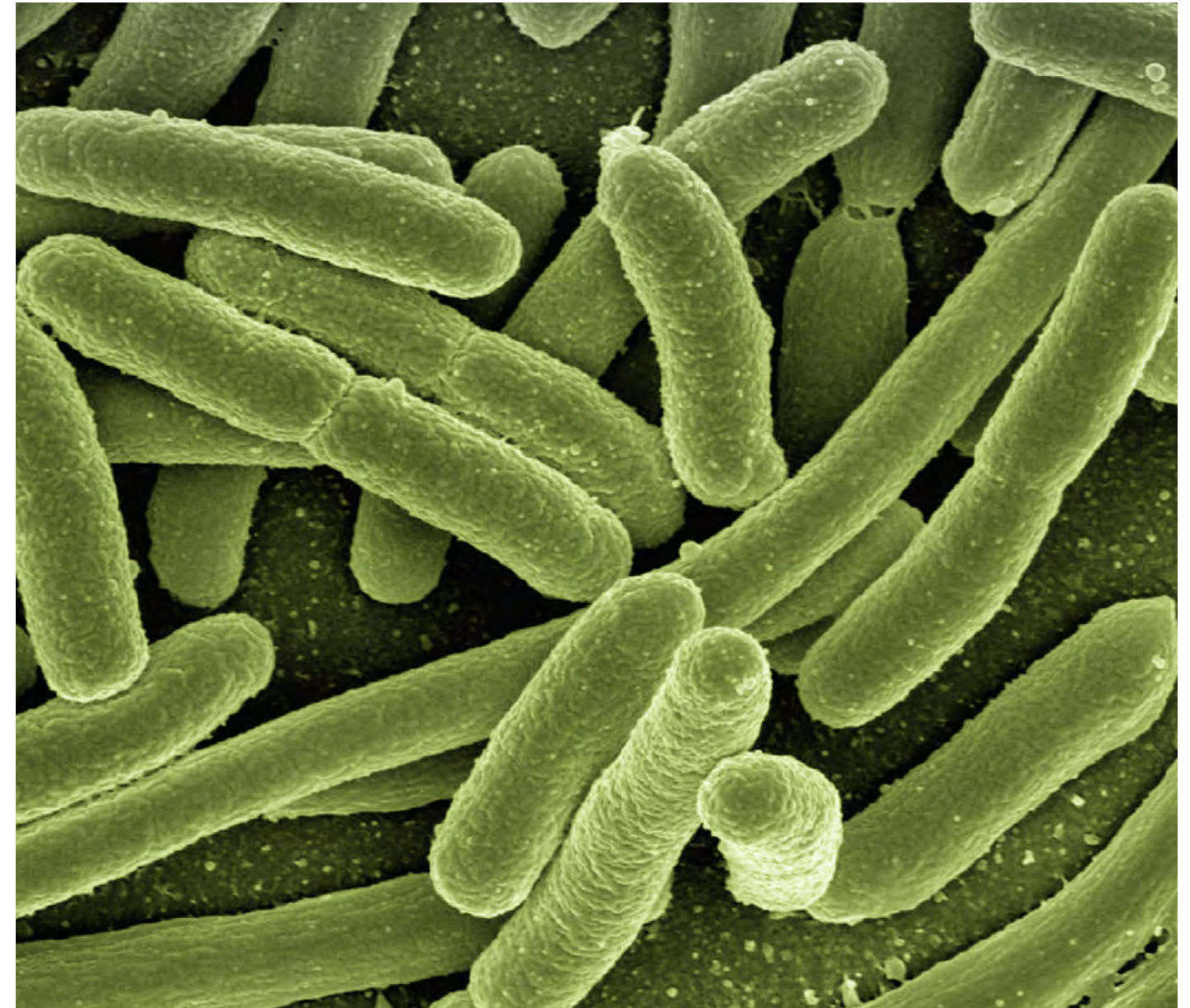
PROCESOS

Algunos ejemplos de PROCESOS son los métodos fermentativos para producir sustancias químicas que solo se producían por síntesis química o por extracción de productos naturales, métodos enzimáticos o químico-enzimáticos para producir productos ya conocidos que solo se podían extraer de fuentes naturales, métodos analíticos para el control de calidad de un proceso, métodos de detección y cuantificación de colonias de microorganismos, métodos de diagnóstico (siempre que no se apliquen directamente al cuerpo humano o animal), nuevos métodos para producir, extraer o purificar nuevas sustancias.

NUEVOS USOS

Algunos ejemplos de NUEVOS USOS son un nuevo uso de la insulina humana para inducir la generación de callos de plantas de maíz, o el conocido caso del sildenafil que la empresa Pfizer comercializa bajo el nombre de *Viagra*. Originalmente, la patente del Sildenafil estaba enfocada para el tratamiento de la hipertensión, pero durante las pruebas clínicas se dieron cuenta que provocaba erecciones aún en pacientes con probada disfunción eréctil. Esto condujo a que la compañía sometiera una segunda solicitud de patente (con 7 años de diferencia respecto de la primera) y a que cambiara totalmente el planteamiento de su comercialización. A su vez, esto le ha dado 7 años más de exclusividad de comercialización del Sildenafil para tratamiento de la disfunción eréctil en los Estados Unidos. En el resto del mundo ya han surgido numerosos genéricos que al público le ahorran entre un 60 y un 80% respecto al precio del *Viagra* (original).

Una patente puede ser de Producto, de Proceso o de Nuevo Uso.



En una misma patente se pueden proteger una o más invenciones de cada una de las categorías mencionadas. Por ejemplo: un nuevo producto, además del método para su producción que, a pesar de que sea muy parecido al que se usa para otros productos semejantes, al ser nuevo el producto, el proceso es intrínsecamente nuevo. Es conocido que las proteínas recombinantes pueden ser producidas por fermentación de *E. coli* modificada genéticamente, sin embargo, si se está protegiendo una nueva proteína recombinante, de manera intrínseca el método para su producción por fermentación de *E. coli* recombi-

nante también resulta nuevo e inventivo, siempre que se protejan de manera simultánea. Además, se podría incluir la protección de diversos usos de la proteína (diagnóstico, terapia, como sonda, para generar anticuerpos específicos, etc.).

El tipo de invención que da un mayor alcance en la protección a su titular es la de producto, pues se tiene el control sobre su producción y comercialización, independientemente de qué uso se le dé y de qué método se utilice para su producción.

¿Qué requisitos debe cumplir una invención para ser patentable?

Los requisitos que debe cumplir una invención para ser meritoria de otorgársele una patente, tras ser presentada como solicitud de patente, son tres, tal y como lo marca la LPI, pero la práctica nos muestra que hay un cuarto requisito. Estos cuatro requisitos son:

NOVEDAD.

La invención debe ser universalmente nueva, es decir, **no debe estar divulgada ni por su supuesto inventor, ni por otros inventores/autores**, con anterioridad a la fecha en que sea presentada como solicitud de patente. El examinador de patentes (persona responsable por parte de la autoridad designada de patentes) realizará búsquedas del *Estado de la Técnica* (ver la descripción de este concepto más adelante), tanto de información científica (artículos indexados), como de información tecnológica (solicitudes de patente y patentes otorgadas en esa y las oficinas de patente de todos los países que haya disponibles), incluso información disponible en Internet (noticias, páginas Web de empresas e instituciones), buscando posibles antecedentes de la invención que se pretende proteger. **En caso de encontrar la misma invención previamente divulgada, determinará que la invención no es nueva y eventualmente la solicitud de patente será desechada.**

Para ser patentable, una invención debe ser Nueva, tener Actividad Inventiva y Aplicación Industrial y estar Suficientemente descrita.

Es muy importante resaltar que México, los EUA y otros países, otorgan por ley, lo que se conoce como el **"año de gracia"**, es decir que permiten que los mismos inventores de una invención que está siendo solicitada como patente, hayan divulgado su invención hasta 12 meses antes de la fecha en que se presenta la solicitud de patente. Sin embargo, otros países y regiones (por ejemplo, Europa), no permiten tal divulgación previa.



ACTIVIDAD INVENTIVA.

Otro requisito que el examinador de patentes debe verificar que nuestra invención cumpla, es que **no sea obvia para quien se considera un técnico medio en el Campo Técnico al que pertenece nuestra invención**. Si, por ejemplo, nuestra invención pertenece al Campo Técnico de la ingeniería de vías metabólicas, un técnico medio debiera tener conocimientos de biología molecular y de vías metabólicas y debiera estar al tanto de las publicaciones que surgen en esos temas. De tal forma que si un técnico medio conoce que en la publicación A se divulga que mediante la inserción de un gen de *B. subtilis* en *E. coli*, se favorece el flujo de carbono hacia la producción de metabolitos aromáticos, y que en la publicación B se divulga el gen de una nueva enzima con actividad equivalente a la del gen mencionado de *B. subtilis*, pero este es de *Z. mobilis*, se entendería obvio que podría reproducir lo hecho en la publicación A, pero con el gen de la enzima divulgada en la publicación B. Este tipo de combinaciones de información de diferentes publicaciones suele ser **una razón común para el rechazo de solicitudes de patente por falta de Actividad Inventiva.**



APLICACIÓN INDUSTRIAL.

Una invención debe tener el potencial de ser producida o explotada en masa sin requerir variaciones personalizadas para cada caso. Esto es, si una invención que fue diseñada para resolver cierto problema de un individuo en particular, tomando en cuenta las situaciones y características en torno al mismo, no puede ser reproducida para otros individuos con problemas iguales pero diferentes características y situaciones, dicha invención carecería de aplicación industrial. Un ejemplo de **invenciones rechazadas** en México y en Europa por falta de aplicación industrial son los tratamientos terapéuticos o quirúrgicos y los sistemas diagnósticos aplicables al cuerpo humano y animal, como se menciona más adelante, por considerarse que dependen en alguna medida del individuo (no así el fármaco empleado en el mismo, o algún equipo o dispositivo diseñado para el procedimiento).

SUFICIENCIA DESCRIPTIVA.

Este es el cuarto requisito, que aplica de *facto*. La práctica nos muestra que existe este **requisito adicional**, que es otro elemento que el examinador de patentes debe juzgar: que la invención esté lo suficientemente descrita en el texto de solicitud, como para que un técnico medio en el Campo Técnico de la invención sea capaz de reproducirla. Típicamente, se presentan problemas con este criterio cuando el alcance, por ejemplo, de un determinado método, se extiende mucho más de lo que realmente probamos de manera experimental. Por ejemplo, cuando decimos que nuestra fermentación funciona con un azúcar como fuente de carbono, esto implica cualquier hexosa, pentosa, heptosa, monosacárido, disacárido, etc. pero resulta que, en nuestros ejemplos, todas las corridas las realizamos sólo con glucosa. Esto, por supuesto, tiene como solución preventiva el reproducir la invención con varios azúcares, en este caso, representativos de los diferentes grupos mencionados, pero esto **antes de registrar la invención como solicitud de patente.**

¿Qué **invenciones** biotecnológicas son patentables y cuáles no lo son?

Las diversas legislaciones sobre patentes manejan ciertas excepciones a la patentabilidad, además de las relativas al atentado contra el orden público, la moral y las buenas costumbres.

Por ejemplo, la Ley mexicana en su artículo 16, tipifica algunos tipos de invenciones, las cuales son claramente excluidas de la posibilidad de otorgárseles una patente. Casi todas ellas tienen que ver con la biotecnología y/o la biología aplicada. Estas son:

- I.- Los procesos esencialmente biológicos para la producción, reproducción y propagación de plantas y animales; esto incluye, por ejemplo, métodos de inseminación artificial (aunque no así los aparatos); la implantación de fetos, la propagación de plantas, etc.
- II.- El material biológico y genético tal como se encuentran en la naturaleza;
- III.- Las razas animales;
- IV.- El cuerpo humano y las partes vivas que lo componen, y
- V.- Las variedades vegetales (que aunque no son patentables, sí pueden ser protegidas por un sistema paralelo que en México es administrado por la SAGARPA y otorga lo que se conoce como un "certificado de obtentor").

En el caso de material biológico y genético, si bien no puede ser patentado tal y como se encuentra en la naturaleza, si es aislado, purificado y puesto en un contexto distinto al que tiene en la naturaleza (particularmente para su industrialización), puede ser protegido sin mayor problema, siempre que cumpla con los requisitos antes mencionados (novedad, actividad inventiva, aplicación industrial y suficiencia descriptiva). Este es el caso de **genes y otros fragmentos de ADN con funciones regulatorias**, por ejemplo, que al ser aislados de sus contextos originales (sus organismos fuente) y clonados en otros hospederos, o bien utilizados como sondas para hibridación con fines diagnósticos (entre otros), pueden ser patentados. Este caso también aplica a enzimas y otras proteínas, partículas pseudovirales, etc., que al ser sacados de su contexto natural y ser expresados o incubados en medios y condiciones distintos a los que enfrenta en la naturaleza, **no tienen problema para ser patentados**.

Excepciones a la patentabilidad

En las diversas leyes de los diferentes países, existen excepciones a la patentabilidad de invenciones que, aun siendo consideradas como tales y cumpliendo los requisitos antes mencionados, **quedan excluidas cuando sus contenidos o forma sean contrarios al orden público, a la moral y a las buenas costumbres o contravengan cualquier disposición legal**. Esta es una limitante particularmente aplicable para muchas invenciones biotecnológicas, por la creencia de que **puedan dañar de alguna forma a la Sociedad**. Por ejemplo, la clonación de seres humanos, la modificación de la identidad genética germinal del humano, el uso de embriones humanos con fines industriales y la modificación de la identidad genética de animales, tal que les ocasione sufrimiento, y que carezca de utilidad médica para el hombre o el animal. No obstante, los conceptos de Moral y Buenas Costumbres cambian de una sociedad a otra y con el tiempo.

Sin embargo, este problema se tornaría aún más drástico cuando la invención es o implica el uso de proteínas y ácidos nucleicos y, aún peor, en el caso de microorganismos y/o líneas celulares, los cuales no se pueden describir de forma suficiente con palabras. En el caso de proteínas y ácidos nucleicos, es suficiente con escribir su secuencia y describir todas las características conocidas (como de dónde a dónde va la región codificante, los UTR's, codones de inicio y término, etc.). En algunos casos con microorganismos es suficiente con decir el número o nombre de la cepa de origen y el banco en el que se compró (si es un banco reconocido) y describir las modificaciones genéticas que se le han realizado (si se conocen con precisión). Sin embargo, en muchos casos eso no es posible y se requiere hacer **un depósito del material biológico en un banco de microorganismos autorizado para fines de patente**. Esta gestión se debe hacer en forma anticipada al registro de la solicitud de patente y tiene un costo por separado. Este proceso requiere de la preparación de liofilizados del microorganismo y su envío al banco de depósito, que emite un certificado del depósito, que debe anexarse a la solicitud de patente.

En México a partir de 2017, se reconoce a la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP, como Autoridad Internacional de Depósito para microorganismos, con fines de patente.



Similarmente, en el caso de **microorganismos aislados de la naturaleza** que son cultivados en medios y condiciones distintos a los que tienen en su contexto natural, pueden ser fácilmente patentados. Con mayor razón para el caso de **hibridomas y líneas celulares**, pues éstas no se encuentran como tales en la naturaleza, sino -en el mejor de los casos- formando parte de tejidos y órganos de animales y plantas. En estos casos, además de los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicación industrial, como ya se mencionó anteriormente, se debe tener cuidado de cubrir el aspecto de suficiencia descriptiva, típicamente mediante el depósito del microorganismo o línea celular.

Todo tipo de proteínas y metabolitos (siempre que cumplan los requisitos antes mencionados) pueden ser patentados, así como también **nuevos usos de proteínas y metabolitos ya conocidos o bien nuevos métodos para su producción, purificación o extracción**. Un caso típico puede ser un nuevo método

químico-enzimático (o fermentativo) para producir un metabolito que antes se obtenía únicamente por extracción a partir de la materia orgánica fuente (vg. una planta), o bien por síntesis química. Aunque los tratamientos médicos y los diagnósticos aplicables al cuerpo humano o animal no pueden ser patentados en México y otros países (a diferencia de los EUA donde sí son objeto de patente), las sustancias que se utilizan para fabricar los medicamentos (útiles en los tratamientos) sí lo pueden ser. Asimismo, **los métodos diagnósticos donde se utilizan muestras humanas o animales para detectarles o cuantificarles alguna sustancia, sí son patentables, ya que el diagnóstico se realiza *in vitro* o *ex vivo***. Tal es el caso también respecto al uso de algunos metabolitos o proteínas para sistemas diagnósticos.

Las plantas transgénicas sí pueden ser patentadas en la medida que se pueden caracterizar de manera precisa.

¿Qué es el *Estado de la Técnica* y para qué me sirve realizar una búsqueda?



El Estado de la Técnica se refiere a lo que coloquialmente se conoce como el "estado del arte". Incluye todo tipo de divulgación: científica, tecnológica, comercial, etc., escrita u oral que se haya realizado en el Campo Técnico al que pertenece una invención en particular. La LPI lo refiere como "el conjunto de conocimientos técnicos que se han hecho públicos mediante una descripción oral o escrita, por la comercialización o por cualquier otro medio de difusión o información, en el país o en el extranjero".

Para redactar la descripción de una invención en una solicitud de patente, debemos conocer lo mejor posible el *Estado de la Técnica* que le corresponde, pues esto nos mostrará los límites del alcance técnico y legal máximo al que podemos extender la protección de nuestra invención.

Como tecnólogos, nos permitirá conocer qué aspectos de nuestra invención deberíamos desarrollar a mayor profundidad o bien a qué aspectos no tiene sentido invertirles por estar ya conocidos e incluso patentados, o bien prevenirnos de invertir recursos (tiempo, dinero y esfuerzo) en el desarrollo de invenciones que, en el mejor de los casos, estarán dominadas por otros, si no es que incluso terminemos inventando el hilo negro.

Para conocer el Estado de la Técnica es necesario llevar a cabo búsquedas en las bases de datos existentes.

En su momento, el examinador de la oficina de patentes (IMPI, en el caso de México) deberá realizar búsquedas del *Estado de la Técnica* para determinar si la invención está cumpliendo con los requisitos de novedad y actividad inventiva.

¿Cómo, quién y cuándo realizar una búsqueda del *Estado de la Técnica*?

Las búsquedas se deben realizar en las bases de datos disponibles (la mayoría de ellas actualmente disponibles vía internet). Se deben llevar a cabo en los diferentes tipos de información disponible, como **bases de publicaciones científicas, tecnológicas e información comercial**. La búsqueda en bases de datos de publicaciones científicas puede realizarse en bases como *Medline*, *Pubmed*, *Web of Science*, etc. Estas bases proporcionan motores de búsqueda que funcionan mediante el **uso de palabras clave** que el usuario debe definir y el uso de operadores booleanos como “AND” y “OR”. Cuando una búsqueda arroja un número de referencias demasiado grande, es conveniente refinarla usando palabras clave que aumenten la especificidad de la búsqueda.

La búsqueda de información tecnológica se puede realizar en bases de patentes.

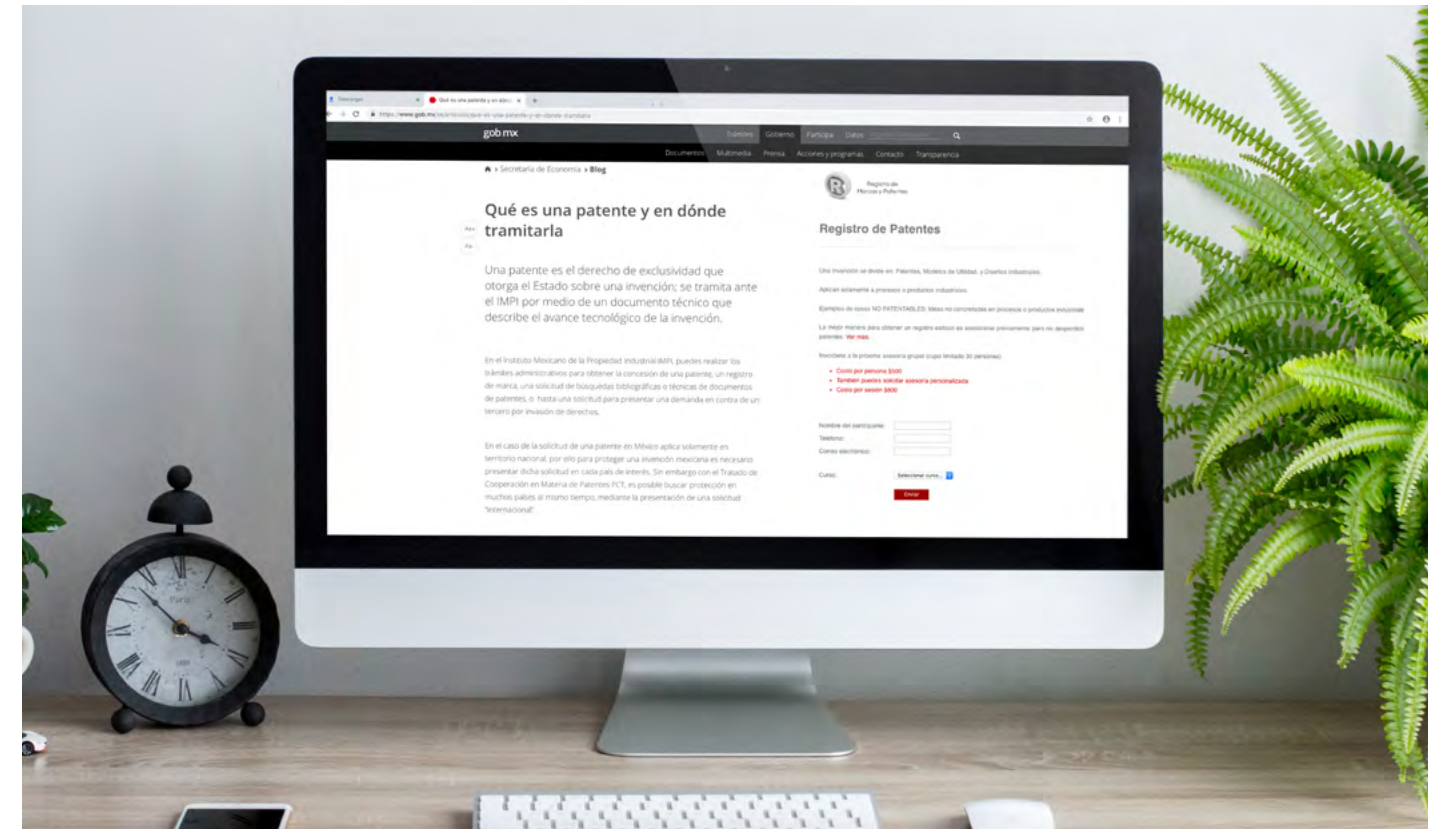
Existen varias bases de patentes gratuitas accesibles vía internet. Algunos ejemplos son la base de solicitudes y la base de patentes otorgada de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos de América (USPTO, por sus siglas en inglés) que nos **permite buscar las solicitudes publicadas y patentes otorgadas por esa oficina de patentes, desde 1976 (en formato full text) y desde 1790 como imagen, con un total de documentos que supera los 8.7 millones, tan solo de patentes de utilidad otorgadas**. Otra es la base de la oficina europea de patentes (EPO, por sus siglas en inglés) llamada *Espacenet*, con acceso a más de 80 millones de documentos a nivel mundial (incluyendo los estadounidenses, latinoamericanos y solicitudes internacionales). Esta última base provee, además, un servicio de traducción automático que da al menos una idea de la

temática del documento. Esta base incluye la base *LATIPAT* que maneja más de 2.5 millones de documentos de patente de Latinoamérica y España. Las ligas a estas bases son las siguientes:

Búsqueda en USPTO
<http://www.uspto.gov/patents/process/search/>

Búsqueda en EPO
<http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>

La forma de realizar las búsquedas es muy parecida a la que se emplea en las búsquedas de artículos científicos; es decir, mediante palabras claves y operadores booleanos. Se debe tener el cuidado de considerar que cada sistema tiene su propia sintaxis, que hay que respetar.



La información de índole comercial es fácil de conseguir utilizando motores de búsqueda en internet tales como *Google*.

En ciertos campos técnicos, es necesario realizar búsquedas en otro tipo de bases especializadas. Por ejemplo, cuando se trata de ácidos nucleicos y/o péptidos y proteínas, se deben realizar **búsquedas en bancos especializados** como el *Genebank*, el *wwPDB*, el *DDBJ*, etc.

Las personas ideales para realizar las búsquedas del *Estado de la Técnica* son los propios desarrolladores (investigador, técnico académico, postdoc o estudiante) pues son quienes conocen de manera global el campo técnico y en qué consiste la invención.

Típicamente, el desarrollador realiza las búsquedas en bases de información científica, pero no en información tecnológica y comercial. Es altamente recomendable que también se lleven a cabo estos otros tipos de búsquedas.

En el IBT al momento de iniciar la redacción de la nueva solicitud de patente, el personal de **la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología**, dependiente de la Secretaría de Vinculación del IBT, encargado de la redacción y gestión de la solicitud de patente, **realizará búsquedas complementarias** para asegurar que la invención cumpla con los requisitos de novedad y actividad inventiva y definir, junto con el desarrollador, el alcance posible para la solicitud de patente.

¿Cómo analizar un documento de patente que forma parte del *Estado de la Técnica*?

En general, **el énfasis del análisis** que hagamos de un documento de patente (ya sea solicitud o patente otorgada) **dependerá del objetivo que se persiga**. Si, por ejemplo, queremos saber si la patente en revisión cubre ciertos aspectos o variantes, el capítulo más importante será el de las reivindicaciones, que es en donde se encuentra el alcance técnico-legal de la invención. Si el objetivo es corroborar que la patente no interfiere con nuestra invención, es recomendable revisar todo el capítulo descriptivo, ya que muchas veces se revelan elementos o modalidades de la invención que, aunque finalmente no sean reclamados en las reivindicaciones, sí pueden hacer parecer obvia o incluso no nueva, nuestra invención.

Generalmente, el capítulo descriptivo suele estar escrito en una estructura muy repetitiva y que va de lo general hacia lo específico. Por ejemplo, si se trata de una molécula orgánica, típicamente hablará de la estructura central de la molécula con sustituyentes R1, R2, etc. y proveyerá una lista de posibles radicales para R1 y otra para R2, etc. Posteriormente, se limitará a ciertos grupos de esos radicales (a los que pertenezcan los que en particular ensayó) y finalmente hablará de aquellas combinaciones específicas que realmente se ensayaron.

Cuando se revisan las reivindicaciones, se debe poner atención en que cada una comienza con una parte descriptiva general de la invención reivindicada, para luego dar lugar a la parte caracterizante de la misma, donde se describen aquellas características que la hacen diferente a lo que ya existía en el Estado de la Técnica. Es este último aspecto el que determina el alcance de cada reivindicación.

¿Quiénes califican como **inventores**?

La Ley mexicana no indica quienes califican o tienen derecho a ser nombrados como inventores. Presume como inventores a aquellos que se ostenten como tales en la solicitud de patente. La responsabilidad de designar quienes deben ir como inventores recae en el o los solicitantes. No obstante, la ética nos hace seguir a aquellos que han avanzado más en una definición justa sobre el derecho de ser inventor. **La práctica en los Estados Unidos considera que el proceso de inventar consiste en dos pasos: concebir la idea y “reducirla a la práctica”, es decir llevarla a cabo experimentalmente.** En este sentido, considera que un inventor es aquel que tiene una aportación intelectual a la concepción de la idea, más que quien lo reduce a la práctica (si fuera otra persona). No obstante, si la reducción a la práctica por el tercero requirió de un *expertise* único y muy especializado, para resolver problemas que se presentaron durante la reducción a la práctica, entonces ese tercero que lo redujo a la práctica es acreedor a ser considerado también como inventor.

Una vez definido quién debe y quien no debe ser inventor, **el derecho de cualquiera de los diversos inventores es exactamente el mismo que el de los demás inventores.** Carece de valor alguno el ser nombrado como primer o último inventor. Aquí no existe el equivalente al “corresponding author”.

En las solicitudes de patente del IBt, típicamente se consideran como inventores a investigadores, técnicos académicos y en algunos casos a estudiantes de posgrado que contribuyeron intelectualmente de manera significativa, a criterio de su tutor.

Un inventor debe ser quien contribuyó intelectualmente, o con un *expertise* muy especializado a la invención

¿Qué derechos y obligaciones adquiere la **UNAM**?

Los derechos de propiedad industrial que se otorgan con un título de patente incluyen dos tipos de derecho. El derecho patrimonial (la propiedad en sí) y **el derecho moral**. El derecho patrimonial pertenece, según las leyes mexicanas (LPI y Ley Federal de Trabajo) **a los inventores o a quienes éstos ceden sus derechos patrimoniales**. En el caso de inventores que realicen la invención bajo el salario de un empleador, en instalaciones del empleador, el derecho patrimonial corresponde a dicho empleador, quien deberá retribuir al inventor, en caso de obtener beneficios económicos por la explotación de la invención.

La Universidad conserva el Derecho Patrimonial sobre la invención patentada.

En el caso del Instituto de Biotecnología, toda invención realizada por su personal académico le pertenece a la UNAM, salvo lo que establezca algún convenio que ésta haya firmado con algún tercero (por ejemplo, con alguna empresa u otra institución).

Como propietaria de la invención, en aquellos casos donde determine que la invención lo amerita, la UNAM tiene el compromiso de realizar las acciones, tales como la redacción, gestión, seguimiento y prosecución de la solicitud de patente y su mantenimiento y defensa ante terceros. Esto incluye el pago de los derechos y tarifas, incluyendo el pago de honorarios de terceros especializados (despachos de patentes, traductores, etc.), cuando así se requiera.

También como propietaria de los derechos de propiedad sobre la invención, la UNAM tiene el derecho de buscar su explotación comercial a través del otorgamiento de licencias o la venta directa de tales derechos, a terceros, recibiendo a cambio un beneficio económico.

Como lo exige la Ley Federal del Trabajo, la UNAM tiene el compromiso de que, **si la invención es explotada comercialmente por algún tercero y ésta recibe beneficios económicos, comparte con los inventores tales beneficios económicos, con una equivalencia al 50 % de los mismos** (según el Reglamento sobre los Ingresos Extraordinarios de la UNAM, vigente). La distribución entre los inventores se pactará en acuerdos firmados por el Director del IBt.



¿Qué derechos y obligaciones adquieren **los inventores**?

Los inventores adquieren el derecho moral a ser considerados y nombrados como tales en el título de la patente y en toda referencia que se haga a la invención. **Este derecho es irrenunciable e inalienable. El inventor puede transmitir o ceder su derecho patrimonial (de explotación) cuando es él quien lo ostenta, más no el derecho moral.** En el caso de personal académico de la UNAM, como se mencionó en la sección anterior, ese derecho patrimonial corresponde por Ley a la UNAM. Los estudiantes y colaboradores externos deben firmar las respectivas cesiones de derecho. En la práctica, se presentan cesiones firmadas aún por los inventores que son personal académico, a modo de ratificación de la titularidad de la UNAM.

El otro derecho que tienen los inventores universitarios es a **recibir una parte de los beneficios** que por concepto de explotación comercial por terceros, reciba la Universidad. El Reglamento de los Ingresos Extraordinarios de la UNAM vigente establece una distribución del 50% sobre los ingresos por licenciamiento y explotación de títulos de propiedad intelectual así como por transferencias de desarrollos tecnológicos a los inventores.

Los inventores universitarios conservan el derecho moral y tienen derecho al 50% de los ingresos que obtenga la Universidad por la explotación de la patente

Los inventores tendrán el compromiso de respaldar a la UNAM en el cumplimiento de realizar las acciones, tales como redacción, gestión, seguimiento y prosecución de la solicitud de patente y su mantenimiento y defensa ante terceros, mediante la entrega

de datos e información, revisión y análisis del *Estado de la Técnica*, la firma de documentos que ratifiquen los derechos de la UNAM a solicitar y que le sea otorgada una patente, etc.

En el caso de estudiantes, **no existe una ley ni una normatividad universitaria que regule la situación de derechos de propiedad de los estudiantes** que participan en algún desarrollo tecnológico que resulte ser patentable. En sentido estricto, no son empleados universitarios que sean protegidos por la Ley Federal del Trabajo. Por otra parte, todo el material que utilizan, las instalaciones y equipos, pertenecen a la UNAM y muy comúnmente son dirigidos por personal de ésta. En algunos casos tienen una beca de la UNAM o una beca del CONACYT, conseguida por participar en un posgrado de la UNAM reconocido en el Padrón del CONACYT. En este sentido, al ingresar al posgrado del IBt, es requisito que firmen una cesión de derechos sobre los resultados del proyecto que desarrollarán.



¿Qué secciones tiene una solicitud de patente?

La normatividad mexicana establece los siguientes capítulos de los que debe constar una solicitud de patente:

- **La Descripción**, donde se describe el *Estado de la Técnica*, se identifica el problema a resolver y se detalla la solución propuesta al problema, es decir, en qué consiste la invención. Más adelante se detallan las subsecciones de la Descripción.
- **Las Reivindicaciones**, que son cláusulas que contienen el alcance técnico-legal de lo que se reclama como propiedad del solicitante, y,
- **El Resumen**.

Dentro del capítulo de **descripción** se incluyen las siguientes secciones:

- **Título**. Se recomienda que sea breve y se relacione con el problema técnico que resuelve la invención, tratar de evitar títulos de ciencia básica.
- **Campo Técnico**. Define el área tecnológica a la que pertenece la invención.
- **Antecedentes**, se refiere a aquellos diversos enfoques que han sido utilizados para tratar de resolver el mismo problema, o problemas relacionados.
- **Breve descripción de las figuras**, a diferencia de un artículo, los pies de figura van en una sección separada, aquí se incluye la explicación de, por ejemplo, qué representan la barra con rayas, o la línea punteada, etc. No se deben detallar los parámetros del experimento, eso debe ir en la sección donde se cite la figura.

- **Descripción Detallada de la Invención**, se debe especificar qué problema técnico resuelve y en qué consiste la solución, así como la manera en que se llegó a ésta y las mejores formas de usarla, típicamente los detalles se envían a ejemplos al final.
- **Referencias**. Típicamente se incluye esta sección, aunque no es obligatoria.
- **Listado de secuencias**. Cuando es necesario, según el tipo de invención (secuencias nucleotídicas y aminoacídicas), hay un formato especial que se debe seguir.
- **Ejemplos**. Esta sección es opcional pero sumamente recomendable de incluir, donde se ilustra la mejor forma de obtener o utilizar la invención, o variaciones de la misma, o bien detallar cómo se llegó a la invención.
- **Materiales y Métodos**. Aunque no es obligatorio, es común usar esta sección para darle mejor fluidez a los ejemplos y descripción detallada.

En el caso de los Estados Unidos y otros países o regiones, las secciones no son muy diferentes a las que se incluyen en un documento de patente mexicano, pero suele utilizarse una sección, antes de la descripción detallada, que se conoce como *summary*, donde se presenta de forma condensada en qué consiste la invención, esto independientemente del resumen que va al final. La publicación de las solicitudes y patentes estadounidenses va acompañada de una carátula con todos los datos bibliográficos concentrados (véase el **anexo 6** donde se ilustra una carátula de una patente estadounidense otorgada al IBt [6], y los **anexos 7 y 8**, donde se incluyen textos completos de una patente mexicana [1] y una europea [5], otorgadas al IBt, donde se resaltan las diferentes secciones).

El capítulo reivindicatorio es el más importante de una solicitud de patente o de una patente. Consta de una o más reivindicaciones, las cuáles pueden ser independientes, o dependientes (de alguna otra). Pueden estar dirigidas a proteger productos, procesos, o usos.

Las reivindicaciones independientes deben iniciar con una breve descripción del objeto de protección en términos de lo que se conoce en el *Estado de la Técnica*, seguidos de una coma y de la frase "caracterizado por", y una o más frases con los detalles que hacen a la invención protegida, nueva, inventiva y con aplicación industrial.

Las reivindicaciones dependientes inician refiriendo al objeto de protección de la reivindicación de la cuál dependen, y especifican alguna característica técnica adicional a las ya mencionadas en la reivindicación independiente.

En la **figura 1**, se presentan reivindicaciones independiente y dependiente, de producto, en este caso un péptido (referidas con los números 1 y 2, respectivamente), de una patente del IBt otorgada en Europa. En la **figura 2**, se presentan reivindicaciones independiente y dependiente, que son de producto, en este caso una composición farmacéutica, (referidas con los números 4 y 5, respectivamente), así como una reivindicación independiente de uso (referida con el número 6), de una patente mexicana otorgada al IBt. En la **figura 3** se muestra el juego reivindicatorio de una patente otorgada al IBt en los Estados Unidos, donde las reivindicaciones 1 y 2 son independiente y dependiente, de producto (composición farmacéutica); similarmente la reivindicación 4 es de una composición inmunogénica, mientras que la 3 es de un proceso (método de tratamiento, el cuál en México no es objeto de patente pero en los Estados Unidos, sí), mientras que la 5 y 6 son reivindicaciones independiente y dependiente de proceso (método de producción).

Figura 1

Claims

1. An isolated and purified peptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID No: 1, SEQ ID No.2, SEQ ID No. 3 and functional equivalent analogs thereof, said functional equivalent analogs sharing at least 83% pairwise sequence identity over the 36 aligned positions of SEQ ID NO.3, said peptide being capable of blocking with high affinity and specificity a potassium channel Kv1.3.
2. A peptide as defined in claim 1 for use in attenuating calcium signaling pathway in-T-lymphocyte cells of a mammal, wherein the use comprises contacting a population of said T-lymphocyte cells with the peptide, preferably wherein said mammal is a human.

Figura 2

4. Una composición farmacéutica con actividad analgésica, caracterizada porque comprende el péptido de la reivindicación 1, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y un vínculo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, caracterizada porque su actividad analgésica es contra los dolores agudo y crónico.
6. El uso de un péptido analgésico con secuencia aminoacídica SEQ.ID.NO:1 en la fabricación de un medicamento con actividad analgésica.

Figura 3

The invention claimed is:

1. A pharmaceutical composition for passive immunization comprising polyclonal antibodies or antigen binding fragments thereof, wherein the polyclonal antibodies or the antigen binding fragments thereof are obtained from animals immunized with a mixture from the following antigens of genus *Loxosceles*:

sphingomyelinase D recombinant *Loxosceles boneti* (SMDrLb1) of SEQ ID NO: 11;
sphingomyelinase D recombinant *Loxosceles reclusa* (SMDrLr1) of SEQ ID NO: 13;
sphingomyelinase D recombinant *Loxosceles laeta* (SMDrLI1) of SEQ ID NO: 19; and
sphingomyelinase D recombinant *Loxosceles laeta* (SMDrLI2) of SEQ ID NO: 21.

2. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the antigen binding fragments thereof are F(ab')₂ fragments.

3. A method of treating envenomation comprising administering the pharmaceutical composition of claim 1, to a subject in an effective amount to treat such envenomation caused by one or more of the spiders of genus *Loxosceles* selected from the group consisting of: *L. laeta*, *L. boneti*, and *L. reclusa*.

4. An immunogenic pharmaceutical composition comprising a mixture of the following recombinant antigens of genus *Loxosceles*:

SMDrLb1 of SEQ ID NO: 11, SMDrLr1 of SEQ ID NO: 13, SMDrLI1 of SEQ ID NO: 19, SMDrLI2 of SEQ ID NO: 21.

5. A method to produce polyclonal antibodies comprising the following steps:

i) mixing the following antigens in proportion 2:2:1:1 respectively: SMDrLb1 of SEQ ID NO:11, SMDrLr1 of SEQ ID NO: 13, SMDrLI1 of SEQ ID NO: 19, SMDrLI2 of SEQ ID NO: 21.

ii) immunizing a non-human animal with the mixture thereof in step i),

iii) obtaining blood serum and isolating the antibodies that are capable of neutralizing the venom of one or more of the spiders *L. Laeta*, *L. boneti* and *L. reclusa*.

6. The method of claim 5 wherein the immunization step (ii) is carried out in *Equus caballus*.

* * * * *

¿Cómo es el procedimiento de la oficina de patentes y cuánto tiempo se lleva?

Una vez presentada la solicitud de patente en la oficina de patentes (IMPI, en el caso de México), esta realizará dos exámenes a nuestra solicitud. El primero es el examen de forma. Dentro de los tres meses siguientes a la presentación, el IMPI se asegurará de que esté la documentación completa y **que reúna los requisitos formales** que marca la LPI, su reglamento y demás disposiciones aplicables. En caso de faltar algún documento o que alguno no cumpla con los requisitos formales, le extiende un oficio de requerimientos al solicitante, dándole un plazo de dos meses para responder (el plazo es prorrogable hasta uno o dos meses adicionales). En todos los requerimientos que el IMPI emite, el plazo para responder siempre es el mismo. La falta de respuesta por parte del solicitante conlleva a un abandono de la solicitud. **Una vez aprobado el examen de forma, la solicitud queda guardada hasta su publicación.**

Hasta antes de su publicación, **la solicitud es confidencial**, teniendo acceso al respectivo expediente sólo el personal autorizado del IMPI y el solicitante. Al cumplirse los 18 meses de su presentación, la solicitud de patente es publicada por el IMPI. En la Gaceta de la Propiedad Industrial, el IMPI publica los datos bibliográficos y el resumen, a la vez incorpora esos datos en su Sistema de Información de la Gaceta de la Propiedad Industrial (SIGA) y escanea como imágenes las páginas que componen la solicitud de patente y son puestas a disposición en la página del Espacenet (por convenio entre el IMPI y la Oficina Europea de Patentes, quien administra dicha base de datos). A partir de ese momento, cualquiera que esté interesado puede conocer el contenido de nuestra solicitud de patente.



Posteriormente a la publicación de la solicitud (sin que el IMPI se imponga un plazo máximo) el IMPI asigna el expediente a uno de sus examinadores, quien llevará a cabo un examen de fondo, con la finalidad de evaluar si nuestra solicitud **cumple con los requisitos** que describimos con anterioridad, es decir, si es nueva, si es inventiva, si tiene aplicación industrial y si está suficientemente descrita y si no contraviene alguno de los artículos de la LPI que como mencionamos, hablan de la excepciones a la patentabilidad.

Con base en esa evaluación decide si se otorga o no la patente correspondiente. Para ello se vale de una búsqueda del *Estado de la Técnica* (ver la sección correspondiente). Una vez que el examinador termina su examen, el IMPI emite un oficio donde informa al solicitante **el resultado**. Si el resultado es favorable, en el mismo oficio se invita al solicitante a pagar por la emisión del título de patente y al menos el primer año de mantenimiento de la misma. Sin embargo, lo usual es que no sea favorable. Derivado de dicho resultado, el solicitante puede responder presentando argumentos para soportar mejor sus reivindicaciones, modificar el texto de su descripción y el juego de reivindicaciones, cuidando siempre que el contenido de lo reformado no sobrepase el alcance de lo originalmente presentado. El examinador tendrá un plazo máximo de 4 meses para presentar otra respuesta ("Acción Oficial"). El número máximo de Acciones Oficiales es de 4, después de los cuales, si no se satisfizo lo requerido por el examinador, ya no se podrá otorgar la patente. En cualquier momento de esta fase, el solicitante (o su representante legal) o alguno de los inventores podrá reunirse con el examinador para presentar y discutir los argumentos.

En el **anexo 7** se muestra una patente mexicana otorgada al IBt [1].

A nivel internacional, el tiempo que las oficinas de patentes de los diferentes países tardan en otorgar una patente, a partir de la fecha de presentación de la solicitud, es muy variable. Entre los mejores tiempos están los de la Oficina de Patentes y Marcas de los EUA, que típicamente tarda de 2.5 a 3 años. En el período 1993-2011, el IMPI solía tardar en promedio unos 5 a 6 años (con extremos que llegaron a los 11 años, en una de nuestras solicitudes). Con la actual administración (2013 a la fecha) el IMPI ha mejorado mucho sus tiempos de repuesta, hasta algo cercano a su homólogo estadounidense.

¿Qué son las solicitudes internacionales de patente?

Como vimos anteriormente, cada Estado (país) tiene la facultad (a través de la autoridad competente) de otorgar o no una patente cuando le es presentada una solicitud de patente. Antiguamente, si una persona física o moral quería proteger su invención en más de un Estado, tenía que hacerlo de manera simultánea en todos los países, lo cual, además de muy costoso, resultaba virtualmente imposible de coordinar. En 1883 se estableció el *Convenio de París*, por medio del cual se garantizó la posibilidad de extender, hasta un año, la propiedad industrial registrada en alguno de los 14 estados miembros, a los otros 13 (actualmente son 175 países contratantes, México es miembro desde 1903). Es decir, se registra primero en el país de origen y luego se cuenta con 12 meses para solicitar la patente en cualesquiera de los otros estados contratantes. Cada una de esas solicitudes es una solicitud nacional registrada en el respectivo país o Estado.

Es común pero incorrecto, el confundir una solicitud internacional de patente con una "patente internacional". Estas últimas, en sentido estricto, no existen. Existen las patentes regionales (como una europea) y, por supuesto, las patentes nacionales.



Conforme el comercio se fue globalizando, la necesidad de extender la protección a un mayor número de países se incrementó y con ello su costo (honorarios del despacho de abogados representante, traducciones y derechos de las oficinas de patente) y complejidad (logística y de procedimiento). En 1970 se firmó en Washington D.C. un tratado internacional, el Tratado de Cooperación en Patentes (PCT, por sus siglas en inglés). Actualmente, 152 países han suscrito este tratado (hasta enero de 2018), el cual permite realizar un trámite único de solicitud que puede posteriormente (hasta 30 o 31 meses después), convertirse en cuantas solicitudes nacionales se desee (mejor conocidas como fases nacionales) o regionales (ya que existen oficinas regionales como la de Europa, Eurasia y 2 oficinas africanas). Durante ese período los costos y la gestión corresponden a un único trámite. Este sistema provee un examen de búsqueda único, una publicación única de la solicitud y le da al solicitante una opinión sobre el cumplimiento o no de los requisitos de patentabilidad. A petición (con el pago correspondiente) del solicitante, también puede llevar a cabo un examen de fondo que le da una mayor certidumbre sobre la posible patentabilidad de la invención.

Al término de los 30 meses que dura la fase internacional, el solicitante puede continuar o no con solicitudes de fases nacionales en cualesquiera de los países o regiones contratantes del PCT, cubriendo a partir de ese momento los costos de traducción (donde sea

necesario), honorarios de despachos de abogados representantes, y derechos de las oficinas de patente correspondientes, cosa que antes del PCT era necesario hacer desde los 12 meses contados desde el registro de la solicitud inicial en el país de origen, para cada país en donde se quería proteger.

Este sistema (PCT) no otorga patentes, es decir, no hay patentes internacionales, sino que al final del proceso, cada una de las oficinas de patente de los países o regiones en los que se decidió continuar la solicitud de patente, será la encargada de otorgar o no la patente correspondiente y definir qué alcance otorga a las reivindicaciones. Uno inicia con una solicitud internacional única y puede terminar con una docena, una cincuentena o un ciento de patentes nacionales otorgadas por diferentes países y/o regiones, cada una con diferentes alcances en sus reivindicaciones. Ver el **anexo 9**, donde se reproduce un resumen de la ponencia titulada "Análisis comparativo del otorgamiento de una misma patente en diferentes países" [13], en el que se comentan las diferencias entre las reivindicaciones otorgadas por las oficinas de patentes de México, Estados Unidos y Europa para una misma invención del IBt. En esta materia se sugiere revisar también el **anexo 10**, donde se presenta un caso cubano [17].

En el **anexo 8** se muestra la carátula de una solicitud internacional de patente [4] presentada por el IBt y la correspondiente patente europea ya otorgada [5].

¿Cuánto cuesta patentar y quién paga en el caso del IBt?

Una solicitud de patente mexicana **tiene dos pagos principales**. Uno por la presentación de la solicitud de patente y el otro al momento en que es otorgada la patente, cuando se paga la emisión del título y el mantenimiento anual por los primeros 5 años. Suele haber otros pagos por cada respuesta que se presente al IMPI o cada enmienda voluntaria que se realiza al texto de la solicitud, pero su monto no suele pasar los \$1,000 pesos (IVA incluido, vigente a mayo de 2018). Los montos por presentación de la solicitud son de \$ 5,278.00 (IVA incluido, vigente a mayo de 2018) más \$69.6 (IVA incluido, vigente a mayo de 2018) por cada página después de las primeras 30, y por la emisión del título más el pago del primer quinquenio de mantenimiento es de \$ 10,334.83 (IVA incluido, vigente a mayo de 2018). Con independencia de estos costos, estarían los honorarios de un despacho de patentes que llevase el caso, que en la UNAM no son necesarios pues nos apoyamos para esta función en la Dirección de Propiedad Intelectual de la Dirección General de Asuntos Jurídicos de la UNAM, para todas las gestiones ante el IMPI. La UNAM, además, goza de un descuento del 50% sobre tales tarifas, por ser una institución de educación superior.

Por su lado, una solicitud internacional tiene costos significativamente más elevados. La presentación de una solicitud internacional tiene un costo variable (dependiente de varios factores, como el número de páginas) pero típicamente cuesta alrededor de los \$3,000 dólares (al 2018). Posteriormente, si se desea que la autoridad internacional realice un examen de fondo, es necesario pagar cerca de otros \$780 dólares (al 2018).

La Coordinación de Innovación y Desarrollo (CID) de la UNAM, desde 2015 ha ofrecido cubrir el 100 % de los costos de derechos de patente en México y tras una evaluación, también de solicitudes internacionales PCT (al menos el pago inicial de la solicitud) de invenciones universitarias.

En el caso de solicitudes de patente en el extranjero, ya sea que se presenten directamente como solicitud de prioridad o como extensión geográfica de otra solicitud (mexicana o internacional), los costos suelen ser significativamente mayores a los de una solicitud nacional, e incluso que los de una solicitud internacional (debido a que para ésta no requerimos que nos represente un despacho legal y nos ahorramos esos costos). En un caso en el IBt, en el que afortunadamente ya teníamos una empresa a la que se le otorgó la licencia exclusiva de la invención, la sola entrada a fases nacionales en 15 países o regiones (Europa y Eurasia), costó \$92,000 dólares en 2010 (un promedio de \$6,133 dólares por cada país o región). Posterior a esto, en los siguientes 3 a 5 años se llevó a cabo la evaluación por parte de cada una de las oficinas de patente y los costos subsecuentes se multiplicaron al menos por dos (ya que por cada acción que emite una oficina de patente, los despachos de abogados cobran por recibirla, traducirla al inglés, enviárnosla, recibir nuestra respuesta, traducirla al idioma del país y presentarla).



¿Quién se encarga en el IBt, de la redacción y gestión de la solicitud de patente?

El IBt, desde el año 1987, cuenta con la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología, desde 2014 dependiente de la Secretaría de Vinculación (STGTT/SV), quien se encarga de la redacción del texto de la solicitud, previa revisión del *Estado de la Técnica* (en documentos de patente), de la preparación de las figuras y listados de secuencias (cuando se requieren) y del seguimiento necesario ante la Dirección General de Asuntos Jurídicos de la UNAM que es la encargada en la UNAM, de hacer la labor ante la ventanilla del IMPI. Por ello, no se requiere contratar los servicios de despachos de patente para que la representen ante el IMPI.

Confidencialidad

Es importante resaltar que el personal de la STGTT/SV, trabaja bajo las cláusulas de confidencialidad que establece el Contrato Colectivo de Trabajo de la UNAM y está sujeto a lo que establece el artículo 134 fracción XIII de la Ley Federal de Trabajo y 82 a 86 de la Ley de Propiedad Industrial, por lo que el manejo de toda la información de las solicitudes de patente (hasta antes de su publicación), son manejadas como información confidencial. Esto aplica tanto para solicitudes nacionales como internacionales.

Como inventores

¿qué pasos debemos tomar y cuándo?

Búsquedas del Estado de la Técnica. Es recomendable que al inicio del proyecto de I+D se realicen búsquedas del *Estado de la Técnica* **para determinar que el resultado** esperable del proyecto efectivamente sea **nuevo e inventivo** y no se desarrolle el proyecto en vano (es decir, que no se pueda proteger). Esto lo pueden realizar los propios inventores o bien hacerlo con apoyo del personal de la STGTT/SV. Estas búsquedas se pueden repetir conforme el proyecto avance y los resultados vayan surgiendo, sobre todo en la medida que resulten inesperados.

Publicación. Como ya mencionamos, la Ley de Propiedad Industrial en México establece **un período de gracia de 12 meses** contados a partir de la fecha de la primera divulgación (escrita u oral, incluyendo tesis -aún de licenciatura-, congresos -ya sea presentaciones orales o poster-) de la invención, para poder registrar la solicitud de patente, sin que dicha publicación afecte su novedad. Sin embargo, este período de gracia no es otorgado por todos los países. Por ello es sumamente recomendable buscar **la protección de la invención por patente** antes de realizar cualquier publicación. Antes de enviar una publicación que contenga todo o parte de los resultados que considere puedan ser una invención, consulte con el personal de la STGTT/SV. Si ya sometió a publicación o incluso salió publicado el material, no espere a que se venza el período de gracia (de 12 meses), consulte con el personal de la STGTT/SV.

Redacción. La redacción del documento de solicitud de patente requiere de las secciones antes mencionadas. **La redacción de la misma puede hacerse básicamente de dos formas:** 1) El personal de la STGTT/SV lleva a cabo la redacción basado en manuscritos (tesis o artículos o sus borradores preliminares) proporcionados por los inventores y en entrevistas con los mismos; y 2) Alguno(s) de los inventores, tras entrevistarse con el personal de la STGTT/SV lleva a cabo la redacción, bajo supervisión del mismo. En cualquiera de los casos, el personal de la STGTT/SV se encargará de la redacción de las reivindicaciones, que son la parte legal que establece el **alcance técnico-legal** que se reclama como propiedad.

Gestión. El personal de la STGTT/SV llevará a cabo la **integración del expediente** (descripción, divulgaciones previas si las hay, cesiones de derechos de cada inventor, comprobante de pago, etc.). Una vez lista la redacción, se apoyará con la Dirección de Propiedad Intelectual de la Dirección General de Asuntos Jurídicos de la **UNAM**, para presentar el expediente al **IMPI**.

En aquellos casos donde se requiera **registrar solicitudes de patente en el extranjero**, la STGTT/SV igualmente integrará el expediente, contratará con un despacho de patentes en el país(es) de interés y se encargará de realizar la gestión por conducto de dicho despacho. Estos gastos (ver sección correspondiente) no son cubiertos ni por la CID/UNAM ni por el IBt. Se espera que antes de llegar a esas instancias ya se cuente con una empresa que tenga una **licencia de la invención y que esté financiando esos gastos**.



¿Qué información debemos proporcionar para la redacción de la patente?

Para permitirle al personal de la STGTT/SV apoyarle con la redacción, será conveniente proporcionarles cualquier manuscrito que se tenga sobre el proyecto (avances de tesis o de artículos), así como revisiones de la literatura (particularmente artículos de revisión). Adicionalmente, será necesario tener una o más entrevistas para que se pueda extraer el máximo posible de información sobre los **resultados y alcances de las aplicaciones de la invención**.

Será necesario informar sobre cualquier **divulgación** previa en artículos, congresos, tesis, etc. y proporcionarles copia.

¿Qué es mejor: la publicación o la patente?

En sentido estricto, no se puede decir que una sea mejor que la otra, ya que tienen diferentes objetivos. La publicación tiene como objeto el dar a conocer con la mayor amplitud posible los **avances o resultados de un proyecto de investigación**. Por su lado, la patente tiene como objetivo la **protección de los derechos de propiedad** sobre los resultados de un proyecto que resuelve un problema técnico, que puedan constituir una invención y que cumplan con los criterios ya mencionados. Con estos **derechos protegidos** (en forma de una exclusividad), el titular puede lucrar con su invención.

La publicación (por cualquier medio) y la protección por patente no son mutuamente excluyentes. Una vez registrada la solicitud de patente, la invención se puede publicar por cualquier medio, sin que afecte el otorgamiento de la respectiva patente. Incluso, si ya se había publicado, algunos países (entre ellos México y Estados Unidos, pero no así Europa) otorgan un año de gracia, a partir de la primera divulgación de la invención, **para poder registrar la solicitud de patente**, sin considerar dicha publicación como parte del *Estado de la Técnica* en contra de la solicitud de patente. Es muy importante ser cuidadosos con las fechas. En cualquier caso, **lo ideal es primero registrar la solicitud de patente y ya luego, si se desea, publicar**.

¿De qué sirve tener una patente?

Al titular de una patente le es conferido por el Estado (país) otorgante, el derecho de exclusividad sobre la explotación comercial de una invención, por 20 años desde la fecha de registro de la solicitud original, esto quiere decir que nadie que no sea él o quien él autorice, podrá producir, ofrecer en venta, vender o incluso importar dicha invención en el territorio que comprende el Estado otorgante. Una patente no es un permiso a su titular para la explotación de la invención, sino **el derecho a impedir a terceros de dicha explotación**. Para que la invención pueda explotarse aún pueden ser necesarios permisos como los de COFEPRIS o de SAGARPA.

¿Por qué debe patentar la UNAM siendo pública?

Para una institución como la UNAM, que es pública y sin fines de lucro, si bien no está entre sus objetivos el explotar comercialmente nada, el poder proteger sus invenciones le puede representar un ingreso importante que puede destinar a complementar sus otros ingresos para dedicarlos a cumplir sus objetivos centrales. Este ingreso puede ser capitalizado en el momento en que otorgue a empresas licencias sobre las tecnologías que ha protegido, con las que les autoriza a explotar la invención protegida y a cambio obtiene beneficios económicos.

Una forma en que la UNAM puede retribuir a la Sociedad, que aporta los impuestos que la mantienen funcionando, es generando invenciones que se puedan convertir en nuevos o mejores productos y servicios (o la tecnología que está detrás de éstos) que sean factibles de ser explotados por terceros, quienes los harán llegar a la Sociedad. Una tecnología que no está protegida por patente es difícil que sea de interés para una empresa, pues tras invertirle tiempo y recursos en llevar el producto al mercado, al no estar protegida, es fácilmente copiada por terceros, con lo que el negocio deja de ser atractivo. Para la Universidad, el poder proteger las invenciones que genera es una forma de hacerlas atractivas a las empresas que puedan completar el círculo virtuoso de innovación, llevando el producto o servicio a la Sociedad, retribuyéndola con ello.



¿Qué es la **explotación comercial** de las patentes?

La **explotación comercial de una patente es precisamente la industrialización y comercialización** de la tecnología o productos que ampara dicha patente (o solicitud si aún no está otorgada). La explotación comercial la puede llevar a cabo el titular de la patente (o solicitud) o bien un tercero que cuente con una autorización (licencia) del titular. Este es el caso de la UNAM, que, por su naturaleza jurídica, no puede llevar a cabo dicha **explotación comercial**, sino que busca el otorgar licencias de explotación a terceros para que lleven a cabo esta actividad de índole industrial y comercial. A cambio, la Universidad negocia el recibir pagos por el otorgamiento de la licencia y de regalías sobre las ventas de los productos que realice el tercero autorizado. Como ya se mencionó, de tales pagos, la **UNAM comparte el 50 % con los inventores** de la tecnología o productos, correspondiéndole otro **30 % a la entidad académica** (en este caso el IBt) donde se desarrolló, mientras que el otro **20 % lo destina a su administración central**.

En el **anexo 11** se reproduce un resumen de la ponencia titulada "Análisis de las transferencias tecnológicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en los últimos 20 años" [9]. En este documento, el término transferencias, incluye las licencias otorgadas sobre documentos de patente.

En el **anexo 12** se reproduce un resumen de la ponencia titulada "Protegiendo y comercializando tecnología de punta, desde una Institución de Educación Superior: Descripción de un caso real" [8]. Donde se describe la protección y explotación comercial (mediante el otorgamiento de una licencia a un tercero), de una tecnología del IBt.



¿Vale la pena **patentar toda invención** que cumpla los requisitos?

Si uno lleva a cabo un estudio de patentabilidad de cada uno de los proyectos que se realizan en el Instituto de Biotecnología, encontrará que la mayoría de ellos **cumplen con los requisitos mínimos** para otorgárseles una patente: **son nuevos, son inventivos** (no son obvios), tienen alguna posible aplicación industrial y pueden ser descritos de manera suficiente. Sin embargo, la mayoría de ellos no están ligados a una aplicación que tenga un claro valor comercial que se vislumbre al corto o mediano plazo. Otros proyectos, en cambio, además de cumplir con los requisitos de patentabilidad, claramente tienen **el potencial de generar productos** en un corto o mediano plazo, que pueden satisfacer necesidades en el mercado.

Dado que **el proceso de registro de una solicitud de patente** (desde la búsqueda del *Estado de la Técnica*, su redacción, su gestión, prosecución, mantenimiento y defensa) implica invertir recursos humanos (horas de los especialistas de la STGTT/SV invertidas) y económicos, es necesario evaluar cuáles posibles invenciones vale la pena proteger por solicitud de patente y cuáles no.

Es necesario hacer un balance entre el riesgo de que todo ese esfuerzo y gasto en gestionar y obtener la patente se quede simplemente en un cajón, en un reporte institucional como un número más, y la oportunidad de que esa tecnología (o invención) llegue a ser efectivamente comercializada, se convierta en **un nuevo satisfactor a la Sociedad** y genere recursos económicos para la Universidad. Está, además, la posibilidad de que la patente no llegue a ser otorgada, pero esta posibilidad normalmente se reduce haciendo búsquedas exhaustivas del *Estado de la Técnica*.



Referencias

1. Barraza, G.A., Clement, H.C. y Corzo, G.A., (2011), Un nuevo péptido analgésico proveniente del veneno de la araña *Brachypelma verdezy*, Patente mexicana No. Mx 348455. (en **anexo 7**).
2. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, (2018), IMPI en cifras, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/292459/IMPI_en_CIFRAS_ene-dic-2017.pdf.
3. Intellectual Property Owners Organization, (2016), Top 300 Organizations Granted U.S. Patents in 2015. (<http://www.ipo.org/wp-content/uploads/2016/06/2015-Top-300-Patent-Owners.pdf>).
4. Possani, L.D., Gurrola-Briones, G., Salas-Castillo, S.P., Ferreira, C.V., Varga, Z.S., Panyi, G. y Gáspár, R., (2008), Vm23 and Vm24, two scorpion peptides that block human lymphocyte potassium channel (Sub-type KV1.3) with high selectivity and decrease the in vivo DTH response in rats, Solicitud internacional de patente WO2008/139243 A1 (en **anexo 8**).
5. Possani, L.D., Gurrola-Briones, G., Salas-Castillo, S.P., Ferreira, C.V., Varga, Z.S., Panyi, G. y Gáspár, R., (2011), Vm23 and Vm24, two scorpion peptides that block human lymphocyte potassium channel (Sub-type KV1.3) with high selectivity and decrease the in vivo DTH response in rats, Patente europea No. EP2158213B1. (en **anexo 8**).
6. Soberón-Chavez, M., Bravo-De La Parra, A. y Gómez-Gómez, I. (2015). Mutant *Bacillus thuringiensis* Cry genes and method of use. Patente Estadounidense No. US 9,090,906. (en **anexo 6**).
7. Trejo M., (2015), Las siete patentes otorgadas al IBt en el 2014, Biotecnología en Movimiento, No. 1, Abril-Mayo-Junio, páginas 18-19. (en **anexo 2**).
8. Trejo M., (2017), Protegiendo y comercializando tecnología de punta, desde una institución de educación superior: Descripción de un caso real, Resumen, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jal. 25-30 de Junio de 2017. (en **anexo 12**).
9. Trejo M. y Galindo E., (2017), Análisis de las transferencias tecnológicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en los últimos 20 años. Resumen, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Nacional, Puerto Vallarta, Jal. 25-30 de Junio de 2017. (en **anexo 11**).
10. Trejo M. y Galindo E., (2017), Análisis histórico de la actividad de patentamiento del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Resumen, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jal. 25-30 de Junio de 2017. (en **anexo 1**).
11. Trejo M. y Patiño M., (2016), Obtiene el IBt cinco nuevas patentes en 2015, Biotecnología en Movimiento, No. 4, Enero-Febrero-Marzo, páginas 16-17. (en **anexo 3**).
12. Trejo M. y Patiño M., (2017), Seis nuevas patentes para el Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, concedidas en 2016, Biotecnología en Movimiento, No. 10, Jul-Ago-Sep, páginas 13-16. (en **anexo 4**).
13. Trejo M. y Patiño M., (2017), Análisis comparativo del otorgamiento de una misma patente en diferentes países, Resumen, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jal. 25-30 de Junio de 2017. (en **anexo 9**).
14. Trejo M. y Patiño M., (2018), Cuatro nuevas patentes para el IBt-UNAM concedidas en 2017, Biotecnología en Movimiento, No. 13, Jul-Ago-Sep, páginas 9-11 (en **anexo 5**).
15. UNAM, Dirección General de Comunicación Social, (2017), UNAM, la institución de educación superior en México con más patentes registradas, Boletín UNAM-DGCS-513, 10 de agosto de 2017. http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2017_513.html.
16. United States Patent and trademark Office (2016). U.S. Patent Statistics Chart Calendar Years 1963 –2015, (https://www.uspto.gov/web/offices/ac/ido/oeip/taf/us_stat.htm).
17. Vázquez M., (2017), Experiencia del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba en la protección por patentes de sus resultados, Biotecnología en Movimiento, No. 11, Oct-Nov-Dic, páginas 10-15. (en **anexo 10**).

Lecturas sugeridas:

Del Río J.A., (2014), El arte de patentar, Ciudad de México, México: Editorial Reverté. ISBN: 8429151710, 9788429151718.

Ewing T., et. al., (2017), Manual de la OMPI de redacción de solicitudes de patente, Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. http://www.wipo.int/edocs/pubdocs/es/patents/867/wipo_pub_867.pdf.

Galindo E., (2013), "La propiedad intelectual" Capítulo 14, pag. 137-150, en: El quehacer de la ciencia experimental, Editorial Siglo XXI. ISBN: 978-607-03-0459-0.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Guía sobre Invenciones Patentes, Modelos de Utilidad, Diseños Industriales y Esquemas de Trazado de Circuitos Integrales. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/133763/GDU_Patentes.pdf.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Guía de Usuario de Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/133764/GU_PCT_2012.pdf.

Organización Mundial de la propiedad Intelectual (2017). Cómo proteger sus invenciones en otros países: Preguntas frecuentes sobre el Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT). <http://www.wipo.int/pct/es/faqs/faqs.html>.

ANEXOS

Lista de anexos

Anexo 1. Análisis histórico de la actividad de patentamiento del Instituto de Biotecnología de la UNAM	44
Anexo 2. Las siete patentes otorgadas al IBt en el 2014	45
Anexo 3. Obtiene el IBt cinco nuevas patentes en 2015	47
Anexo 4. Seis nuevas patentes para el Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, concedidas en 2016	49
Anexo 5. Cuatro nuevas patentes para el IBt-UNAM concedidas en 2017	53
Anexo 6. Carátula de patente: Mutant <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry genes and method of use	56
Anexo 7. Patente Mexicana: Un nuevo péptido analgésico proveniente del veneno de la araña <i>Brachypelma verdezy</i>	57
Anexo 8. Carátula de Solicitud Internacional y Patente Europea: Vm23 and Vm24, two Scorpion peptides that block human lymphocyte potassium channel (Sub-type KV1.3) with high selectivity and decrease the <i>in vivo</i> DTH response in rats	93
Anexo 9. Análisis comparativo del otorgamiento de una misma patente en diferentes países	165
Anexo 10. Experiencia del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba en la protección por patentes de sus resultados	166
Anexo 11. Análisis de las transferencias tecnológicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en los últimos 20 años.	172
Anexo 12. Protegiendo y comercializando tecnología de punta, desde una institución de educación superior: Descripción de un caso real	173



ANÁLISIS HISTÓRICO DE LA ACTIVIDAD DE PATENTAMIENTO DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM

Mario Trejo Loyo y Enrique Galindo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos C.P. 62230, mtrejo@ibt.unam.mx.

Patentes, Biotecnología

Introducción. El Instituto de Biotecnología (IBt) fue fundado en 1982 (como Centro de Investigación en Ingeniería Genética y Biotecnología, CEINGEBI) con una vocación que incluye la generación de conocimiento de frontera, donde el IBt ha publicado a lo largo de su historia cerca de 2,600 artículos en revistas internacionales (165 artículos en 2016). También ha participado activamente en la formación de recursos humanos: ha graduado cerca de 1,070 estudiantes de posgrado (51 en 2016) (1). El IBt tiene también una clara vocación en desarrollo tecnológico. Desde 1987 creó su Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología (adscrita a su Secretaría de Vinculación desde 2014), que se ha encargado de apoyar y propiciar la protección por patente de los desarrollos tecnológicos generados. El presente trabajo presenta un análisis histórico de la actividad tecnológica (en términos de propiedad industrial) del IBt, que ha sido complementaria de su actividad científica.

Metodología. Estudio de Caso.

Resultados. El quehacer tecnológico del IBt, representado por el número de convenios de colaboración y desarrollo tecnológico con la industria, el número de solicitudes de patente y de patentes otorgadas en México y en el extranjero, así como los convenios de licenciamiento y transferencia de tecnología ha tenido también un crecimiento considerable y muy peculiar comparado con otras entidades académicas de la propia universidad (2). En este trabajo se analiza el caso de las patentes.

Como se muestra en la **figura 1**, la presentación de nuevas solicitudes de patente (SP) inició desde los primeros años del Centro/Instituto, con un promedio menor a 1 SP/año, incrementándose significativamente a partir de 1997 (a 5.25 SP/año), hasta alcanzar su máximo entre 2005 y 2012, con 12.5 SP/año. Esto fue potenciado, por un lado, por la negociación de convenios de cotitularidad con universidades extranjeras con acceso a recursos económicos que financiaron la presentación de solicitudes de extensión geográfica de las SP y, por otro lado, por el licenciamiento de solicitudes de patente a empresas que también financiaron las extensiones geográficas de las SP licenciadas.

La concesión de patentes toma un tiempo considerable que puede ir desde los 3 a los 11 años, dependiendo de la eficiencia de la oficina de patentes de cada país. En México esta función estuvo inicialmente a cargo de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, donde los tiempos solían extenderse hasta 10 años. Actualmente, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (creado a finales de 1993) es el encargado de esta labor, con tiempos de resolución cercanos a los 4 años. Por esto mismo, la primera patente otorgada al IBt (en los Estados Unidos)

apareció hasta 1990 y las primeras otorgadas en México, hasta 1993.



Fig.1 Evolución del número de patentes otorgadas y de solicitudes de patente del IBt.

En los últimos 12 años el IBt ha estado cosechando el otorgamiento de las solicitudes que estuvo sometiendo desde 8 años antes y se espera que esta tendencia continúe incrementándose en los siguientes años.

A 2016, al IBt se le han otorgado un total de 88 patentes (50 en México y 38 en el extranjero). El total histórico de las SP es de 207 (73 en México y 134 en el extranjero). Ello significa que al IBt se le han otorgado el 42.5% de las patentes que ha solicitado.

Conclusiones. Si bien los principales quehaceres del IBt están en la generación de conocimiento y en la formación de recursos humanos, la creación, desde los inicios del IBt, de una estructura *ad hoc* de gestión tecnológica, le ha permitido impulsar exitosamente la protección por patente de sus principales desarrollos tecnológicos.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo de la Dirección General de Asuntos Jurídicos/UNAM y el financiamiento de los costos involucrados en la gestión de una parte de patentes por la Coordinación de Innovación y Desarrollo/UNAM.

Bibliografía.

1. Informes Institucionales del CEINGEBI 1982-1990 y del IBt 1992-2016.
2. Calderón M. (2013). La gestión de patentes universitarias. El Caso de la UNAM. Dirección General de Evaluación Institucional, UNAM. México. 67 pags.

Propiedad Intelectual, Tecnología y Empresa

Sección a cargo de Carlos Peña (carlosf@ibt.unam.mx)



El IBt tiene una muy importante capacidad de generación de conocimiento y una parte de él tiene el potencial de ser explotado comercialmente, para lo que requiere de la protección de los derechos de propiedad intelectual. La propiedad intelectual es un elemento fundamental de la innovación y nuestro instituto es la entidad académica de la UNAM que más patentes genera. Por otro lado, la formación de empresas de base tecnológica continúa siendo un tema pendiente en nuestro país. Específicamente en el caso de la Biotecnología, la brecha es muy amplia, con los

países desarrollados. Aunque cada vez son más los programas que apoyan este tipo de acciones, estamos lejos de alcanzar los niveles que, como país, requerimos para un desarrollo competitivo. Esta sección pretende compartir con nuestros lectores diversas experiencias del IBt orientadas al emprendimiento de base científica, desde la creación de nuevas empresas en diferentes campos de la biotecnología, así como la protección intelectual del conocimiento generado.



Las siete patentes otorgadas al IBt en el 2014

M. A. Mario Trejo Loyo

Las invenciones descritas a continuación, son una muestra que da idea de la amplitud de temas que desarrolla el IBt: biotecnología agrícola (nuevas toxinas insecticidas), biotecnología industrial (cultivos más eficientes en la producción de proteínas recombinantes) y biotecnología para la salud (nuevos péptidos antibióticos, potencial medicamento para enfermedades autoinmunes y nuevas generaciones de antivirales). Este trabajo de investigación y desarrollo, reforzado por un trabajo cuidadoso de gestión tecnológica, a cargo de la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología, dependiente de la Secretaría de Vinculación, le permite al IBt ser una de las entidades académicas de la UNAM y del país, líder en la producción de tecnología y su transferencia al sector productivo, buscando beneficiar a la sociedad a la que se debe.

La primera de las invenciones, generada por el grupo del Dr. Lourival Possani, se refiere a dos péptidos (pequeñas proteínas) aislados del veneno de un alacrán mexicano, con la capacidad de controlar un canal de potasio que ha sido identificado como pieza clave en el posible tratamiento de enfermedades autoinmunes (como la psoriasis, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple) e incluso el rechazo de órganos. Esta invención y las patentes que le dan protección,

se encuentran licenciadas a una empresa mexicana para su explotación comercial. Durante 2014, a esta invención se le otorgaron otras tres patentes a partir de las respectivas solicitudes de fase nacional (extensiones geográficas de una misma solicitud internacional) en Euroasia (Patente No. FA 200901530); en Australia (Patente No. AS 2007353147) y en China (Patente No. ZL 200780053305.7). Estas tres nuevas patentes se suman a otras 8 patentes de fases nacionales que ya se le han otorgado en años previos en otros países y/o regiones (como Europa) a esta misma invención.

La patente No. US 8,822,157 fue otorgada por la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos en 2014. Se trata de una patente divisional de otra patente primaria (otorgada en 2012) que conjuntamente se refieren a una invención generada por el grupo de los Dres. Mario Soberón y Alejandra Bravo y consiste en la utilización de la proteína "S-Layer" en el control de insectos plaga, así como en un método para detectar la presencia de este tipo de proteínas insecticidas. Este método utiliza técnicas moleculares como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), técnica similar a la que se utiliza en pruebas de paternidad y pruebas de reconocimiento forense de cadáveres. Las proteínas tipo "S-Layer" forman parte de la capa más externa de algunas bacte-

rias y se les ha involucrado en la virulencia y patogenicidad de bacterias Gram-positivas. Esta patente se encuentra licenciada a una compañía estadounidense para su explotación en la selección de cepas de microorganismos con potencial uso en la generación de plantas transgénicas con una toxicidad mejorada contra insectos plaga específicos.

...este trabajo de investigación y desarrollo, reforzado por un trabajo cuidadoso de gestión tecnológica a cargo de la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología, dependiente de la Secretaría de Vinculación, le permite al IBt ser una de las entidades académicas de la UNAM y del país, líder en la producción de tecnología y su transferencia al sector productivo, buscando beneficiar a la sociedad a la que se debe..."

De las tres patentes otorgadas en México en 2014, una es la patente No. MX 320050 concedida al grupo del Dr. Lourival Possani y se refiere a un conjunto de nuevos péptidos que tienen actividad antibiótica, diseñados a partir de la secuencia (orden de los aminoácidos que lo componen) de otros péptidos que también poseen capacidad antibiótica. Los antibióticos de naturaleza peptídica y/o su combinación con antibióticos convencionales pueden ayudar a resolver problemas de resistencia múltiple en patógenos. Por ello, es importante continuar la búsqueda de nuevos y mejores péptidos antibióticos. Una empresa mexicana se encuentra actualmente evaluando la posibilidad de obtener una licencia (permiso para la explotación comercial, que otorga el dueño de la patente a un tercero) de uno de los péptidos que protege esta patente.

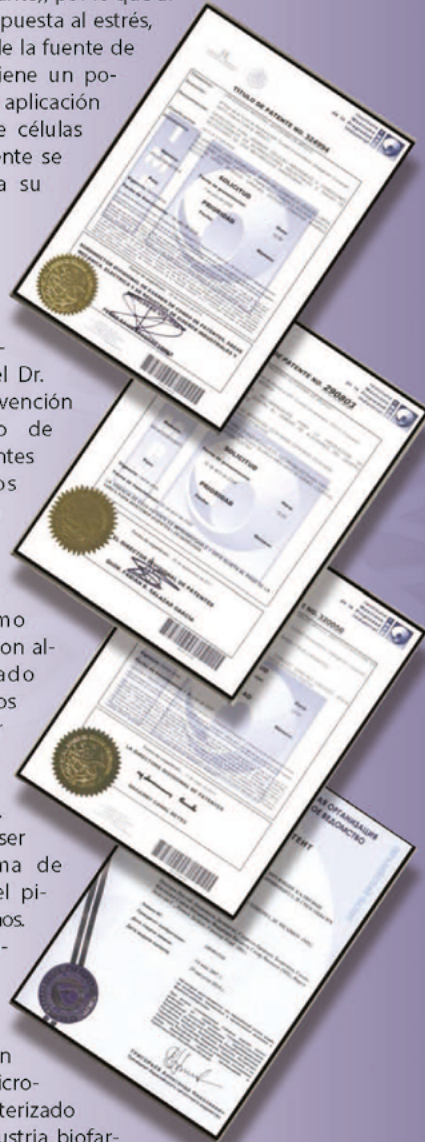
La patente No. MX 324994, otorgada en México, fue generada por el grupo del Dr. Tonatiuh Ramírez y se refiere a un método para lograr que las células de microorganismos en cultivo sean más eficientes en la producción de algún producto recombinante (particularmente proteínas recombinantes, es decir proteínas propias de otra especie, ahora producidas en microorganismos). Para ello, las células se modifican genéticamente para reducir su capacidad de respuesta al estrés ocasionado por la fluctuación en el oxígeno disuelto que se presenta durante su cultivo. Normalmente esa capacidad de respuesta al estrés, lejos de contribuir a la eficiencia de producción, consume innecesariamente la fuente de carbono

(generalmente un azúcar como la glucosa), en lugar de dedicarla a producir el producto de interés (proteína recombinante), por lo que al reducir la capacidad de respuesta al estrés, se elimina la "distracción" de la fuente de carbono. Esta invención tiene un potencial muy interesante de aplicación en cultivos industriales de células recombinantes y actualmente se encuentra disponible para su licenciamiento.

La tercera patente otorgada en México a finales de 2014 al IBt, No. MX 325627, fue desarrollada por el grupo del Dr. Baltazar Becerril. Esta invención comprende un conjunto de anticuerpos recombinantes humanos (anticuerpos de origen humano que son producidos en el laboratorio mediante técnicas de biología molecular usando bacterias como biofábricas), que junto con algunos que se han generado con anterioridad y otros que están en proceso de ser generados, son capaces de neutralizar el veneno de alacranes mexicanos. Su combinación puede ser comercializada en forma de un antiveneno contra el piquete de alacranes mexicanos. Los anticuerpos se encuentran en el formato de cadena sencilla ("single chain") y pueden ser producidos por fermentación en la bacteria *E. coli* (un microorganismo muy bien caracterizado y de amplio uso en la industria biofarmacéutica) -evitándose el uso de caballos, como se hace con los antivenenos comerciales actuales-. Por otro lado, al ser de origen humano, se reduce la posibilidad de generar reacciones secundarias adversas en administraciones subcutáneas. Tres empresas mexicanas han mostrado interés en obtener una licencia para comercializar este antiveneno.

Contacto: mtrejo@ibt.unam.mx

El autor agradece el apoyo del Mtro. Martín Patiño Vera.



PROPIEDAD INTELECTUAL, TECNOLOGÍA Y EMPRESA

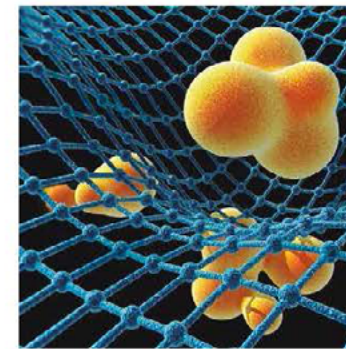
Sección a cargo de Carlos Peña (carlosf@ibt.unam.mx)

El IBt tiene una muy importante capacidad de generación de conocimiento y una parte de él tiene el potencial de ser explotado comercialmente, para lo que requiere de la protección de los derechos de propiedad intelectual. La propiedad intelectual es un elemento fundamental de la innovación y nuestro Instituto es la entidad académica de la UNAM que más patentes genera. Por otro lado, la formación de empresas de base tecnológica continúa siendo un tema pendiente en nuestro país. Específicamente en el caso de la Biotecnología, la brecha es muy amplia, con los países desarrollados.

Aunque cada vez son más los programas que apoyan este tipo de acciones, estamos lejos de alcanzar los niveles que, como país, requerimos para un desarrollo competitivo. Esta sección pretende compartir con nuestros lectores diversas experiencias del IBt orientadas al emprendimiento de base científica, desde la creación de nuevas empresas en diferentes campos de la biotecnología, así como la protección intelectual del conocimiento generado.

Obtiene el IBt cinco nuevas patentes en 2015

M. en C. Mario Trejo Loyo y M. en C. Martín Patiño Vera



Nanoestructura



Larvas de mosquito

En el 2015, se le otorgaron al IBt cinco patentes: de ellas, tres se otorgaron en México, una en Estados Unidos y otra en Corea. Cuatro de ellas ya han sido licenciadas a empresas. Tres están relacionadas a bioinsecticidas provenientes de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Once académicos del IBt figuran como inventores.

A los investigadores Laura Palomares y O. Tonatiuh Ramírez, además del estudiante Ricardo M. Castro les concedieron la patente mexicana MX330383B por la invención de un método analítico capaz de diferenciar y cuantificar nanoestructuras (estructuras en escalas de décimas de micra) compuestas de monobloques de proteínas virales, diferenciadas en su estructura final. Las proteínas estructurales de los virus son producidas artificialmente con fines biotecnológicos y dependiendo de las condiciones ambientales, forman uno u otro tipo de estructura o partícula pseudoviral (que es inocua) con características fisicoquímicas e inmunológicas similares a las de los virus en las células. Los virus son de gran importancia médica y veterinaria por las variadas enfermedades que pueden provocar y la mejor arma para combatirlos es el desarro-

llo de nuevas vacunas. Actualmente, el uso de la biotecnología nos permite producir vacunas a partir de proteínas virales ensambladas en su forma natural, pero sin material genético, de tal manera que son inocuas, pero que activan el sistema inmunológico de las personas o animales para que combatan al virus nativo (patógeno). Por ello resulta indispensable contar con un método que nos permita cuantificar proteínas virales de manera precisa y diferenciada en este tipo de vacunas, para asegurar su calidad y seguridad en su uso en animales y humanos, así como en otras aplicaciones (acarreadores de fármacos y nano conductores, entre otras). Esta patente se encuentra disponible para su licenciamiento.

A los investigadores Mario Soberón y Alejandra Bravo, en 2015 se les otorgaron tres patentes: dos en México, una de ellas en colaboración con Leobardo Serrano de la Planta Piloto del IBt y la otra con Lilianna Pardo; y una en los Estados Unidos, en conjunto con Isabel Gómez (los tres, investigadores del IBt). Las tres patentes están relacionadas con sus trabajos con toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt).

La primera, es la patente MX334860B que comprende un nuevo bioinsecticida en forma de pequeñas perlas, letales para las larvas del mosquito transmisor del virus del dengue. El dengue es un problema que afecta a regiones tropicales y subtropicales del mundo, que son las más habitadas de nuestro planeta. El mosquito transmisor (*Aedes aegypti*) se reproduce en cualquier depósito casero

de agua. Para combatir enfermedades transmitidas por mosquitos se han utilizado masivamente insecticidas altamente contaminantes y tóxicos, que afectan a otros insectos y animales benéficos, inclusive al hombre. Por lo anterior, la formulación desarrollada es de suma importancia para combatir la enfermedad, sin dañar el medio ambiente, ya que incluye dos variantes (cepas) de esporas de Bt, que producen toxinas Cry letales para las larvas de estos mosquitos cuando las ingieren, pero inocuas para otros organismos y el medio ambiente. Al aplicar las perlas de la formulación en los depósitos de agua como tinacos abiertos y/o piletas, comunes sobre todo en comunidades rurales, mantiene su efectividad de manera sostenida. Como las perlas flotan en el agua, las larvas se siguen alimentando de ellas (porque contienen un atrayente), así mantienen su eficacia por mucho tiempo en el depósito de agua, aún después de varios recambios del líquido. Esta patente fue licenciada a una empresa mexicana creada ex profeso para su explotación comercial.

Pese a la conocida capacidad de las toxinas Cry para controlar insectos plaga de diferentes cultivos y bosques o bien, insectos que transmiten enfermedades en humanos, estos insectos llegan a desarrollar resistencia a dichas toxinas, lo que puede constituir un importante impedimento para continuar con su exitoso uso como bioinsecticidas. Recientemente los inventores del IBt, descubrieron el mecanismo de acción de las toxinas Cry de Bt (de tres dominios) y con la colaboración del Dr. Bruce Tabashnik de la Universidad de Arizona, encontraron en cuál de sus pasos es donde se llega a presentar resistencia en poblaciones de insectos que han sido extensivamente expuestos a estas toxinas, permitiendo la sobrevivencia y reproducción del insecto. Esta segunda invención, recientemente otorgada en México como la patente MX329408B, se basa en la aplicación de estos conocimientos. Los inventores propusieron una modificación a nivel genético en estas toxinas Cry, que evita que la toxina requiera de cierto procesamiento en el intestino del insecto, que es el paso donde se genera la resistencia, dando lugar a lo que llamamos toxinas Cry-Mod. La toxina generada sigue siendo efectiva contra insectos sensibles, pero además lo es contra los insectos que desarrollaron resistencia a la toxina Cry. Las toxinas Cry-Mod pueden ser aplicadas a los insectos plaga como bio-insecticidas por aspersión o sus genes pueden ser incorporados a plantas que sintetizan su propio bioinsecticida.

El gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) y el gusano del tabaco (*Manduca sexta*) son insectos plaga de gran importancia comercial (con pérdidas cercanas a los mil millones de dólares anuales en maíz, a nivel mundial). Existen las toxinas Cry1C y Cry1Ab que son útiles en el control

de estas plagas, no obstante siempre hay la necesidad de nuevas variantes de toxinas que sean más potentes contra estos insectos. En la tercera invención, otorgada como patente estadounidense US 9,090,906 B2, los inventores encontraron nuevas variantes (mutantes) de estas toxinas que mejoran cuantitativamente su actividad contra estos insectos plaga, al sustituir de manera específica y dirigida algunos de los aminoácidos (compuestos de los que están constituidas todas las proteínas, como las toxinas Cry) de los que forman parte del tercer dominio de las respectivas toxinas, por otros aminoácidos diferentes.

Estas dos últimas patentes forman parte de una familia de patentes que fueron licenciadas en 2009 a una empresa norteamericana para su explotación comercial. Tanto la nueva formulación para el control de larvas del mosquito vector del dengue, como las toxinas Cry-Mod y las nuevas variantes de las toxinas Cry1Ab y Cry1C (protegidas por estas tres patentes) son una contribución del IBt-UNAM al arsenal de herramientas disponibles para el control de plagas de cultivos agrícolas y vectores de impacto en la salud humana.

Finalmente, otra de las invenciones otorgadas como patente en el año 2015, en este caso a los inventores del IBt Lourival Possani, Georgina Gurrrola y César Ferreira (todos ellos investigadores) y colaboradores húngaros liderados por el Prof. Gyorgy Panyi, se refiere a dos péptidos (cadenas de aminoácidos de corta longitud) aislados del veneno de un alacrán mexicano, que presentan actividad de moduladores de un canal de potasio muy especial (proteínas de la membrana que permiten el paso selectivo de iones específicos, en este caso, potasio), ya que ha sido identificado como pieza clave en el posible tratamiento de enfermedades autoinmunes (como la psoriasis, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple) e incluso el rechazo de órganos. Durante 2015 se otorgó la fase nacional (extensión geográfica de una misma solicitud internacional) en Corea (patente 10-1524517). Esta invención y las patentes que le dan protección, se encuentran licenciadas a una empresa mexicana para que busque su explotación comercial, mediante el desarrollo y venta de medicamentos que contengan dichos péptidos, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

La redacción y gestión de todas estas patentes, así como la negociación con las empresas fueron apoyadas por la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología, dependiente de la Secretaría de Vinculación del IBt-UNAM.

Contacto: mtrejo@ibt.unam.mx



Gusano del maíz



BIOTECNOLOGÍA EN MOVIMIENTO 17

PROPIEDAD INTELECTUAL, TECNOLOGÍA Y EMPRESA

Sección a cargo de Carlos Peña Malacara (carlosf@ibt.unam.mx)

El IBt tiene una muy importante capacidad de generación de conocimiento y una parte de él tiene el potencial de ser explotado comercialmente, para lo que requiere de la protección de los derechos de propiedad intelectual. La propiedad intelectual es un elemento fundamental de la innovación y nuestro Instituto es la entidad académica de la UNAM que más patentes genera. Por otro lado, la formación de empresas de base tecnológica continúa siendo un tema pendiente en nuestro país. Específicamente en el caso de la Biotecnología, la brecha es muy amplia, con los países desarrollados.

Aunque cada vez son más los programas que apoyan este tipo de acciones, estamos lejos de alcanzar los niveles que, como país, requerimos para un desarrollo competitivo. Esta sección pretende compartir con nuestros lectores diversas experiencias tanto del IBt como de otras instancias nacionales e internacionales orientadas al emprendimiento de base científica, desde la creación de nuevas empresas en diferentes campos de la biotecnología, así como la protección intelectual del conocimiento generado.

Seis nuevas patentes para el Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, concedidas en 2016

Mtro. Mario Trejo Loyo y Mtro. Martín Patiño Vera

En 2016 le fueron otorgadas seis nuevas patentes al Instituto de Biotecnología de la UNAM, cuatro de ellas se concedieron en México, una en Canadá y otra más en Brasil. Doce académicos del IBt figuran entre los inventores. Cuatro de estas patentes ya han sido licenciadas a empresas.

Uno de los consorcios de investigación más productivos del Instituto de Biotecnología es el que trabaja con venenos de animales ponzoñosos, siendo los alacranes los más estudiados en el Instituto. Los investigadores Gerardo Corzo y Lourival Possani, lograron obtener el pasado 2016 tres de las seis patentes concedidas a la UNAM, con invenciones del Instituto.

Los venenos de alacranes suelen tener una connotación negativa, ya que un amplio número de personas son envenenadas tras ser picados por alacranes. En este caso, la patente mexicana No. 339085, obtenida por Lourival Possani (Investigador Emérito de la UNAM y dos veces Premio Nacional de Ciencias: 1996 categoría científica y 2016 categoría tecnológica) junto con el Técnico Académico Timoteo Olamendi y la postdoctorante Blanca Inés García, se enfocó en el uso de péptidos recombinantes (cadenas cortas de aminoácidos, producidas en bacterias modificadas genéticamente) de la toxina Pgs (la principal toxina del alacrán *Parabuthus granulatus*, ori-

nario de Sudáfrica), para generar, en animales (típicamente caballos), anticuerpos en contra de dicha toxina y que, una vez procesados, resultan ser eficaces antivenenos para tratar el envenenamiento por el piquete de tales arácnidos. En su patente, los inventores describen el trabajo desde la secuenciación de la toxina nativa (aislada del veneno del alacrán), la clonación del gen correspondiente que codifica para dicha toxina, su transformación en la bacteria *Escherichia coli* y su producción en forma recombinante por fermentación sumergida usando esa bacteria. Asimismo, divulgan cómo la toxina así producida es purificada e inoculada en mamíferos (ratones a título ilustrativo) que a su vez producen anticuerpos neutralizantes de dicha protei-

Página opuesta: Esta cuarta estampilla postal conmemorativa del Día Mundial de la Propiedad Intelectual plasma dos grandes inventos mexicanos que han, no solo mejorado la vida sino agregado valor a la misma; uno de ellos se refiere a la antiveneno contra el veneno del alacrán, invento del mexicano Alejandro Alagón Cano, que ha logrado salvar vidas de aquellas personas que han sido envenenadas por la picadura del alacrán, principalmente en las zonas cálidas de México. Este antiveneno (faboterápico), innovación biotecnológica, hoy en día es un medicamento aprobado por la FDA de Estados Unidos.



BIOTECNOLOGÍA EN MOVIMIENTO 13

El canal de potasio Kv1.3, se encuentra presente sólo en linfocitos T y no en otras células del organismo



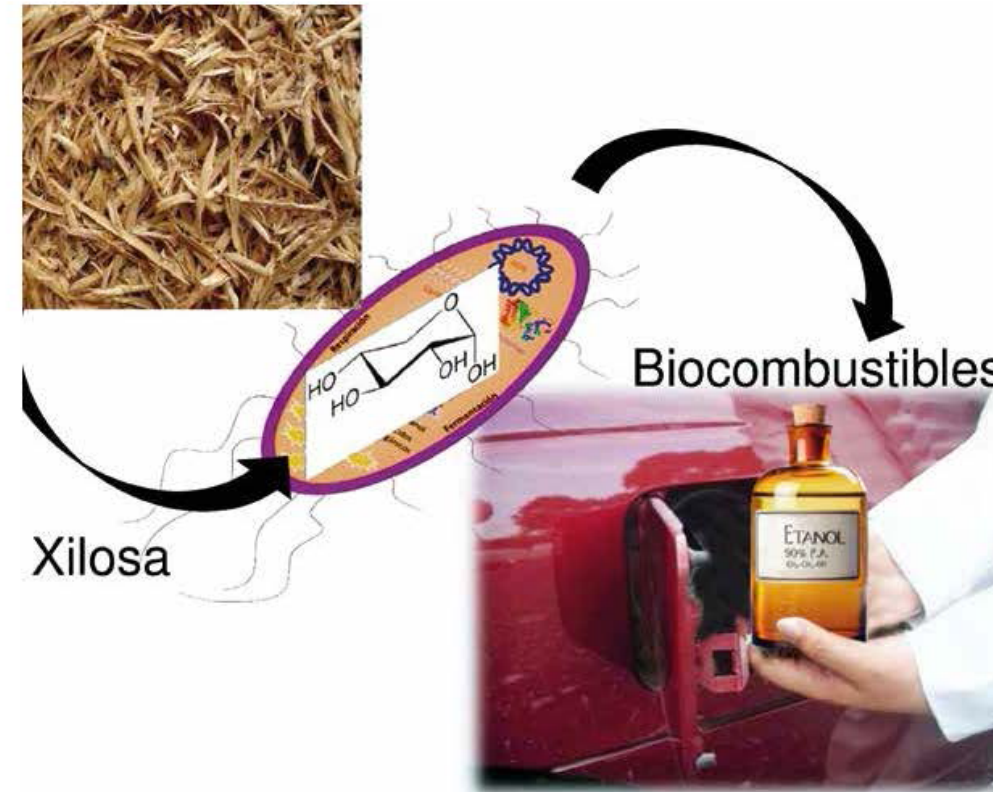
Archivos Compartidos: U01EM-3R6os



na, para lo que se purifican tales anticuerpos a partir de la sangre de los ratones. Estos mismos resultados se pueden extrapolar a caballos en lugar de ratones, con lo que se estaría en posibilidad de producir el antiveneno a escala comercial. Esta patente ha sido transferida para su explotación comercial a una empresa mexicana.

Con esta transferencia, se pone a disposición de la sociedad (sudafricana en este caso) una solución a su problema de alacranismo.

Otra característica de los venenos de alacranes y de otros animales ponzoñosos, es que entre sus componentes, suele haber sustancias con un potencial de aplicación médica. En este sentido, el veneno del alacrán mexicano *Centruroides suffusus suffusus* posee un péptido que resultó tener actividad antibiótica, eficaz contra cepas microbianas resistentes a múltiples drogas, tales como



las bacterias *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* y el hongo *Candida albicans*, agentes patógenos causantes de infecciones del tracto digestivo, tracto respiratorio y/o de la piel. En su patente mexicana No. 343126, Gerardo Corzo junto con Lourival Possari, apoyados por los entonces estudiantes Francisca García y Elba Villegas, muestran el trabajo desde la secuenciación de la toxina nativa (aislada y purificada del veneno del alacrán), hasta su síntesis química. Asimismo, divulgan las evidencias de su actividad antibiótica *in vitro* contra cepas de los microorganismos resistentes ya mencionados. Esta patente está siendo transferida a una empresa mexicana para su explotación comercial en aplicaciones tópicas para tratar infecciones dérmicas, así como padecimientos tales como el pie diabético.

En este mismo sentido, en una investigación con el veneno de otro alacrán mexicano, se obtuvo otra de las invenciones concedidas como patente en el año 2016 a los investigadores Lourival Possari, Georgina Gurrola y César Ferreira (todos ellos investigadores del Instituto) y colaboradores húngaros liderados por el investigador Gyorgy Panyi, con el apoyo de la entonces estudiante Saida Patricia Salas. Se refiere a dos péptidos aislados del veneno del alacrán, que presentan actividad de moduladores de un canal

de potasio (Kv1.3) muy especial, ya que ha sido identificado como pieza clave en el posible tratamiento de enfermedades autoinmunes (como la psoriasis, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple, entre otras) e incluso del rechazo de órganos. No menos importante resulta el hecho de que estas moléculas son sumamente específicas contra este canal de potasio, sin afectar otros tipos de canales de potasio presentes en células de los distintos tejidos del organismo. Durante 2016 se otorgó la fase nacional (extensión geográfica de una misma solicitud internacional de patente) de esta invención en Canadá (patente No. CA 2686216). Esta invención y las patentes que le dan protección, se encuentran licenciadas a una empresa mexicana para

La xilosa es una pentosa (azúcar de 5 carbonos) que es uno de los principales componentes de la lignocelulosa, que a su vez es el material más abundante en la naturaleza, formando parte del tejido vegetal



BIOTECNOLOGÍA EN MOMENTO 15

La redacción y gestión de estas patentes, así como la negociación con las empresas fueron realizadas por la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología, dependiente de la Secretaría de Vinculación, del IBT-UNAM, con apoyo legal de la Dirección General de Asuntos Jurídicos y con financiamiento para el pago de derechos de patentes nacionales por parte de la Coordinación de Innovación y Desarrollo, de la UNAM.

que busque su explotación comercial, mediante el desarrollo y venta de medicamentos que contengan dichos péptidos, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

En el área de investigación y desarrollo de tecnologías para la producción de biocombustibles y/o plásticos biodegradables, los investigadores Alfredo Martínez y Guillermo Gosset, quienes forman parte del consorcio de investigación de Ingeniería Metabólica y Biología Sintética del Instituto, con apoyo del entonces estudiante de doctorado José Utrilla Carreri y de la Técnico Académico Luz María Martínez Mejía, obtuvieron la patente mexicana No. 340987. La invención se refiere a una proteína encontrada en la bacteria *Escherichia coli* y a una mutante de dicha proteína generada en el Instituto, que sirven como novedosos transportadores de xilosa. También en la patente se incluye al ADN codificante de dicha proteína y su mutante; y su uso por métodos biotecnológicos para la fermentación de caldos provenientes de hidrolizados de residuos vegetales con altas concentraciones de xilosa. Esta invención está orientada a su uso en procesos de fermentación sumergida para la producción de productos de interés comercial como son los bioplásticos biodegradables (como el PLA o polímero de ácido láctico) y biocombustibles (como el etanol). Esta patente está disponible para su licenciamiento.

En la agricultura, el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) es un insecto plaga de gran importancia comercial (con pérdidas cercanas a los mil millones de dólares anuales en maíz, a nivel mundial). Existen las toxinas Cry1C y Cry1Ab que son útiles en el control de estas plagas, no obstante siempre hay la necesidad de

nuevas variantes de toxinas que sean más potentes contra este insecto. En la invención, concedida como patente mexicana No. MX 339784 (previamente concedida en 2015 en los Estados Unidos), los investigadores María Alejandra Bravo, Mario Soberón e Isabel Gómez, todos investigadores del Instituto de Biotecnología, encontraron nuevas variantes (mutantes) de estas toxinas que mejoran cuantitativamente su actividad contra este insecto plaga, al sustituir de manera específica y dirigida algunos de los aminoácidos (compuestos de los que están constituidas todas las proteínas, como las toxinas Cry) de los que forman parte del tercer dominio de las respectivas toxinas, por otros aminoácidos diferentes. Esta patente se encuentra licenciada a una empresa norteamericana.

Finalmente, se obtuvo la patente brasileña No. PI 0621953-5 derivada de un desarrollo conjunto entre el IBT y el CIAD-Culiacán, en donde participaron Enrique Galindo, Leobardo Serrano y Martín Patiño, con apoyo de la entonces estudiante de Licenciatura Lizette Trujillo; en colaboración con los investigadores José Amador Carrillo, Raúl Allende y Raymundo Saúl García del CIAD-Culiacán. Esta invención comprende un método para la producción de un biofungicida en polvo, efectivo para controlar la antracnosis (provocada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*), enfermedad que causa las manchas negras en los mangos. El biofungicida tiene una vida de anaquel de, al menos, dos años sin necesidad de refrigeración. Se reivindicaron diferentes formulaciones a base de la levadura *Rhodotorula minuta* y de la bacteria *Bacillus subtilis* que, utilizadas de manera preventiva, permiten controlar la antracnosis reduciendo significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad, así como el uso

de fungicidas químicos altamente tóxicos para el consumidor y el medio ambiente. El uso de la formulación patentada también reduce la pérdida de peso durante el almacenamiento postcosecha de la fruta, alargando la vida de anaquel del fruto, permitiendo así exportar el producto a mercados asiáticos de mayor valor agregado. La tecnología derivada de esta patente se licenció a una empresa spin-off del Instituto de Biotecnología que lanzó al mercado en 2012 el primer biofungicida 100% mexicano. Previamente, en 2011 se obtuvo la patente mexicana que protege la misma invención (ambas son fases nacionales de una misma solicitud internacional de patente).

Contacto: mtrejo@ibt.unam.mx



16 BIOTECNOLOGÍA EN MOVIMIENTO

PROPIEDAD INTELECTUAL, TECNOLOGÍA Y EMPRESA

Sección a cargo de Carlos Peña Malacara (carlosf@ibt.unam.mx)

El IBT tiene una muy importante capacidad de generación de conocimiento y una parte de él tiene el potencial de ser explotado comercialmente, para lo que requiere de la protección de los derechos de propiedad intelectual. La propiedad intelectual es un elemento fundamental de la innovación y nuestro Instituto es la entidad académica de la UNAM que más patentes genera. Por otro lado, la formación de empresas de base tecnológica continúa siendo un tema pendiente en nuestro país. Específicamente en el caso de la Biotecnología, la brecha es muy amplia, con los países desarrollados.

Aunque cada vez son más los programas que apoyan este tipo de acciones, estamos lejos de alcanzar los niveles que, como país, requerimos para un desarrollo competitivo. Esta sección pretende compartir con nuestros lectores diversas experiencias tanto del IBT como de otras instancias nacionales e internacionales orientadas al emprendimiento de base científica, desde la creación de nuevas empresas en diferentes campos de la biotecnología, así como la protección intelectual del conocimiento generado.

Cuatro nuevas patentes para el IBT-UNAM

CONCEDIDAS EN 2017

Mtro. Mario Trejo Loyo y Mtro. Martín Patiño Vera

Continuando con la tradición de liderazgo del IBT en la obtención de patentes [1, 2 y 3], en el año 2017, le fueron otorgadas a la UNAM cuatro nuevas patentes para invenciones generadas en el Instituto de Biotecnología, tres de ellas concedidas en México y una más en China. En estas cuatro invenciones participaron diez académicos del IBT. Cabe mencionar que dos de estas patentes ya fueron licenciadas a empresas (una mexicana y otra norteamericana).

Consolidado como uno de los consorcios de investigación más productivos de invenciones patentables del IBT, los grupos liderados por los investigadores Gerardo Corzo y Lourival Possani, que trabajan con venenos de animales ponzoñosos, generaron las tres invenciones que fueron otorgadas como patentes mexicanas por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial en 2017.

En el primer caso, la patente mexicana No. MX 352715 B, fue generada por Gerardo Corzo junto con la doctorante Ligia Luz Corrales (actualmente investigadora en la Universidad de Antioquia, Colombia) y el entonces posdoctorante Alexis Rodríguez (actualmente investigador asociado en la UAEM, Morelos), a través del estudio y generación de nuevos péptidos lineales recombinantes (cadenas cortas de aminoácidos, producidas en bacterias modificadas genéticamente) o sintetizados químicamente, con base en secuencias primarias de péptidos humanos, llamados defensinas. La invención de los nuevos péptidos comprende su uso como antibióticos para el control de infecciones por bacterias resistentes a diversos antibióticos, incluyendo una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un hospital mexicano. También se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos



péptidos y opcionalmente su combinación con otros antibióticos comerciales. Esta patente ha sido licenciada para su explotación comercial a una empresa mexicana. Con esta licencia, se pone a disposición de la sociedad mexicana, en primera instancia, una solución al problema de resistencia a los antibióticos comerciales de diversos patógenos resistentes.

Las defensinas son péptidos antibióticos que se encuentran naturalmente en tejidos epiteliales, además de mucosas orales y nasales, pulmón, glándulas salivarias, intestino, estómago, riñones y ojos, entre otros, tanto de seres humanos como de muchos animales.



Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos idénticos entre sí, esto es, son clones, porque son producidos por una población homogénea de células del sistema inmune, es decir, todos los clones proceden de una población particular específica de células madre. Es posible producir anticuerpos monoclonales que reconozcan y se unan específicamente a un antígeno.



2 Los venenos de animales ponzoñosos suelen causar diversos y graves problemas de envenenamiento a los humanos, por la picadura, mordedura o el simple contacto con la piel en algunos casos, sin embargo, también se ha determinado que las toxinas (proteínas y/o péptidos que componen los venenos) aisladas y purificadas, suelen tener diversas propiedades fisiológicas de interés médico. En este contexto se encuentra, la patente mexicana No. MX 348455 B, obtenida por Gerardo Corzo junto con la Técnico Académico Herlinda Clement y el entonces estudiante Guillermo Barraza (actualmente investigador en la UACH, Cd. Juárez, Chihuahua). Se trata de un nuevo analgésico que es un péptido lineal que fue originalmente aislado del veneno de la araña *Brachypelma verdezi*. Este nuevo péptido fue denominado BvTx47 y su actividad analgésica fue probada en ratones macho. El péptido comprende 40 aminoácidos y puede ser obtenido por síntesis química, o bien mediante la técnica del ADN recombinante (o ingeniería genética). En el mercado de productos para la salud existe una amplia gama de analgésicos con los inconvenientes efectos secundarios como la dependencia, o un estado de movimiento incontrola-

do en el paciente, entre otros. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos analgésicos, particularmente de naturaleza peptídica (a base de aminoácidos), que puedan presentar potencialmente menos efectos secundarios.

El grupo de trabajo del Dr. Corzo estudia e investiga moléculas peptídicas con propiedades farmacológicas de interés humano y veterinario, entre ellas este nuevo péptido analgésico, cuyo estudio ha dado buenos resultados a nivel de laboratorio. Con el fin de continuar con pruebas pre-clínicas y aumentar el valor agregado a las invenciones anteriores, se necesita -entre otros- del apoyo de inversionistas emprendedores (que conformaran un prospecto de negocio, incluyendo la estrategia financiera, legal, comercial y tecnológica), en la producción a mayor escala de dichas moléculas proteicas, lo cual incluye el escalamiento de la síntesis y purificación del producto, servicios de validación de métodos y pruebas de estabilidad, así como pruebas de toxicidad aguda y sub-crónica en modelos de ratón, por mencionar algunas.

3 En el tercer caso, se obtuvo la patente MX346878 B que protege un nuevo anticuerpo monoclonal dirigido contra una región específica de un receptor de las células dendríticas (células presentadoras de antígenos que estimula la respuesta inmune al presentar en su superficie el antígeno ante las otras células del sistema inmune) de pollo, que tiene un gran potencial como "acarreador" de antígenos, es decir, como potenciador de vacunas. Esta invención fue generada por Lourival Possani junto con la entonces posdoctorante Martha Pedraza (actualmente investigadora en el IBt), el entonces posdoctorante Pavel Espino (actualmente investigador en la UACH, Chihuahua, Chihuahua) y el Técnico Académico Alejandro Olvera. A modo de ejemplo del potencial de este anticuerpo como acarreador de antígenos, la proteína H5 del virus de la influenza aviar (tipo H5N2) producida en el laboratorio por métodos recombinantes, se conjugó químicamente al anticuerpo, para que éste la acarrease hasta las células dendríticas, en el organismo del pollo. Ahí, cuando los linfocitos T detectan un antígeno presentado por una célula dendrítica, se activan y proliferan. A su vez, los linfocitos T activan a los linfocitos B, que producen los



anticuerpos encargados de la defensa contra el patógeno, en este caso el virus de la influenza aviar.

Al ser inyectado en gallinas, estas generaron anticuerpos capaces de reconocer a la proteína H5 del virus de la influenza, confirmando que los nuevos anticuerpos monoclonales (ya conjugados al antígeno) tienen el potencial de ser utilizados como potenciadores de vacunas en pollos. Estos anticuerpos monoclonales pueden potencialmente ser utilizados como acarreadores de cualquier antígeno patogénico en contra del cual se quiera obtener una vacuna aviar. Como existe similitud (a nivel de secuencia en las cadenas de aminoácidos) de la región específica del receptor de las células dendríticas de pollo con las correspondientes regiones de varios vertebrados, se probó el reconocimiento cruzado del anticuerpo monoclonal en células de humano, de cerdo y de perro, mostrando que el mismo anticuerpo monoclonal reconoce las correspondientes regiones de receptores de células dendrítica de células de humano y de cerdo, por lo que tiene el potencial de ser usado para generar vacunas (al ser conjugado químicamente a los respectivos antígenos de patógenos) no sólo para pollos, sino también para cerdos y humanos.

4 La última de las patentes se encuentra en el contexto de la agricultura. Para el cultivo del maíz, el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) es una plaga de gran importancia comercial (con pérdidas cercanas a los mil millones de dólares anuales en maíz, a nivel mundial). Para combatirlo, existen las toxinas (proteínas con actividad insecticida) Cry1C y Cry1Ab, producidas por diversas cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que son útiles en el control de estas plagas, no obstante, siempre hay la necesidad de nuevas variantes de toxinas que sean más potentes contra este insecto. En la invención, concedida como patente china No. CN 103748228 (previamente concedida en 2015 en los Estados Unidos y en el 2016 en México), los doctores María Alejandra Bravo, Mario Soberón e Isabel Gómez, todos investigadores del Instituto de Biotecnología del Campus Morelos de la UNAM, encontraron nuevas variantes (mutantes) de estas toxinas que incrementan su actividad contra este insecto plaga, al sustituir de manera específica y dirigida algunos de los aminoácidos (compuestos de los que están constituidas todas las proteínas, como las toxinas Cry) de los que forman parte de una región específica de la proteína

(tercer dominio) que constituye a las respectivas toxinas, por otros aminoácidos diferentes. Esta patente se encuentra licenciada a una empresa norteamericana.

La redacción y gestión de estas nuevas patentes, así como la negociación con las empresas fue realizada por la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología, dependiente de la Secretaría de Vinculación, del IBt-UNAM, con apoyo legal de la Dirección General de Asuntos Jurídicos y con financiamiento para el pago de derechos de patentes nacionales por parte de la Coordinación de Innovación y Desarrollo, de la UNAM.

Contacto: mtrejo@ibt.unam.mx



Referencias:

[1] M. Trejo (2015). Las siete patentes otorgadas al IBt en el 2014. *Biotecnología en Movimiento* No. 1, Abril-Mayo-Junio, páginas 18-19.

[2] M. Trejo y M. Patiño (2016). Obtiene el IBt cinco nuevas patentes en 2015. *Biotecnología en Movimiento* No. 4, Enero-Febrero-Marzo, páginas 16-17.

[3] M. Trejo y M. Patiño (2017). Seis nuevas patentes para el Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, concedidas en 2016. *Biotecnología en Movimiento* No. 10, Jul-Ago-Sep, páginas 13-16.

Todas ellas disponibles en: <http://biotecmov.org>



(12) **United States Patent**
Soberon-Chavez et al.

(10) **Patent No.:** US 9,090,906 B2
(45) **Date of Patent:** Jul. 28, 2015

- (54) **MUTANT *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY GENES AND METHODS OF USE**
- (75) Inventors: **Mario Soberon-Chavez**, Cuernavaca (MX); **Alejandra Bravo-De La Parra**, Cuernavaca (MX); **Isabel Gomez-Gomez**, Mexico City (MX)
- (73) Assignee: **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO (MX)**
- (*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 530 days.
- (21) Appl. No.: **13/435,586**
- (22) Filed: **Mar. 30, 2012**
- (65) **Prior Publication Data**
US 2012/0255071 A1 Oct. 4, 2012
- Related U.S. Application Data**
- (60) Provisional application No. 61/469,380, filed on Mar. 30, 2011.
- (51) **Int. Cl.**
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
- (52) **U.S. Cl.**
CPC *C12N 15/8286* (2013.01); *C07K 14/325* (2013.01)
- (58) **Field of Classification Search**
None
See application file for complete search history.
- (56) **References Cited**
- U.S. PATENT DOCUMENTS**
- | | | | | |
|--------------|-----|---------|-------------------|------------|
| 5,246,852 | A * | 9/1993 | Payne et al. | 435/252.31 |
| 5,366,892 | A | 11/1994 | Foncerrada et al. | |
| 5,593,881 | A | 1/1997 | Thompson et al. | |
| 5,723,756 | A | 3/1998 | Peferoen et al. | |
| 5,747,450 | A | 5/1998 | Ohba et al. | |
| 5,840,868 | A | 11/1998 | Warren et al. | |
| 5,942,664 | A | 8/1999 | Baum et al. | |
| 2012/0210462 | A1 | 8/2012 | Bermudez et al. | |
- FOREIGN PATENT DOCUMENTS**
- | | | | | |
|----|----------------|----|---------|--|
| WO | WO 99/24581 | A2 | 5/1999 | |
| WO | WO 2009/132850 | A1 | 11/2009 | |
- OTHER PUBLICATIONS**
- Gomez et al 2006 The Journal of Biological Chemistry 281(45): 34032-34039.*
Atsumi et al 2005 Applied and Environmental Microbiology 71(7): 3966-3977.*
De Maagd et al 1999 Applied and Environmental Microbiology 65(10): 4369-4374.*
Herrero et al 2004 Biochemistry Journal 384: 507-513.*
Atsumi, S., et al., "Location of the *Bombyx mori* Aminopeptidase N Type 1 Binding Site on *Bacillus thuringiensis* CryIAaToxin," *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, vol. 71(7), pp. 3966-3977.

Avisar, D., et al., "The Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1C and Cry1E Separate Structural Domains in the Interaction with *Spodoptera littoralis* Gut Epithelial Cells," *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279(16), pp. 15779-15786.

De Maagd, R., et al., "Domain III Substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1A(b) Results in Superior Toxicity for *Spodoptera exigua* and Altered Membrane Protein Recognition," *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. 62(5), pp. 1537-1543.

DeMaagd, R., et al., "How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world," *TRENDS in Genetics*, 2001, vol. 17(4), pp. 193-199.

Del Rincón-Castro, M., et al., "Antagonism between Cry1Ac1 and Cyt1A1 Toxins of *Bacillus thuringiensis*," *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65(5), pp. 2049-2053.

Environmental Protection Agency, "Bacillus thuringiensis Cry1Ab protein and the genetic material necessary for its production (pTDL004 or pTDL008) in Event T303-3 or T304-40 cotton plants (006525) Experimental Use Permit Fact Sheet," 2006, pp. 1-3, .epa.gov/opbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006525.htm.

Environmental Protection Agency, "Bacillus thuringiensis delta endotoxins (Cry1Ac and Cry1C) encapsulated in killed *Pseudomonas fluorescens* (006457) Fact Sheet," 2010, pp. 1-2, .epa.gov/opbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006457.

GenBank Accession No. M13898.1, "*B. thuringiensis* (berliner) crystalline entomocidal protoxin gene, complete cds," 1993, 2 pages.

GenBank Accession No. AAA22336.1, "delta-endotoxin, partial [*Bacillus thuringiensis*]," 1993, 1 page.

GenBank Accession No. AAA22541.1, "insecticidal crystal protein [*Bacillus thuringiensis*]," 1993, 1 page.

GenBank Accession No. AAA22542.1, "insect control protein [*Bacillus thuringiensis*]," 1993, 1 page.

GenBank Accession No. AAA22334.1, "cryIIIb2 [*Bacillus thuringiensis*]," 1993, 1 page.

GenBank Accession No. AAC43266.1, "CryIIIa [*Bacillus thuringiensis*]," 1994, 2.

GenBank Accession No. AAA74198.1, "Cry3Bb2 [*Bacillus thuringiensis*]," 1995, 1 page.

GenBank Accession No. H5475.1, "Sequence 2 from patent US 5466597," 1996, 1 page.

GenBank Accession No. AAA50255.1, "crystal protein [*Bacillus thuringiensis* serovar morrisoni]," 2002, 1 page.

GenBank Accession No. AAS79487.1, "insecticidal crystal protein [*Bacillus thuringiensis*]," 2004, 1 page.

GenBank Accession No. AAW05659.1, "Sequence 2 from patent US 6797490," 2004, 1 page.

GenBank Accession No. AY955268.1, "*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1C (cry1Ca) gene, complete cds," 2005, 3 pages.

GenBank Accession No. CAA68482.1, "unnamed protein product [*Bacillus thuringiensis*]," 2005, 1 page.

(Continued)

Primary Examiner — David H Kruse
(74) **Attorney, Agent, or Firm** — Ballard Spahr LLP

(57) **ABSTRACT**

The invention provides nucleic acids obtained from strains of *Bacillus thuringiensis* encoding δ -endotoxins having pesticidal activity against insect pests including Lepidoptera. Particular embodiments of the invention provide isolated nucleic acid molecules encoding mutant pesticidal polypeptides, pesticidal compositions, expression cassettes, and transformed microorganisms and plants comprising a nucleic acid molecule of the invention. Such compositions find use in methods for controlling plant pests.

37 Claims, No Drawings



TÍTULO DE PATENTE No. 348455

Titular(es): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Domicilio: 9º Piso de la Torre de Rectoría S/N, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, Distrito Federal, MÉXICO

Denominación: UN NUEVO PÉPTIDO ANALGÉSICO PROVENIENTE DEL VENENO DE LA ARAÑA *BRACHYPELMA VERDEZY*.

Clasificación: CIP: A61K38/04; C07K14/00
CPC: A61K38/04; C07K14/00

Inventor(es): GUILLERMO ALBERTO BARRAZA GARZA; HERLINDA CATALINA CLEMENT CARRETERO; GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE

SOLICITUD

Número: MX/a/2011/010576
Fecha de Presentación: 7 de octubre de 2011
Hora: 11:58

Vigencia: Veinte años
Fecha de Vencimiento: 7 de octubre de 2031
Fecha de Expedición: 1 de junio de 2017

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 69 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 18 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES
NAHANNY CANAL REYES

Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES[00001000000403252793]Servicio de Administración Tributaria[1695]MX/2017/46827/MX/a/2011/010576[Título de patente normal]1027/RGZ[Pág(s)]1|PVEzdnJU2E7gdcaT5Z9bvSZC+rs=

Sello Digital:
dMxAkpn04KYsOQZDVNAWfOMMCcH48+JlnBdFhYQ1h9ghhErU/5Ns/HraV6Qq48uwx4QJIVgSptolLOUwn+k65kv9
4dEHM07wc132JUqRcd11nOgOgLD0+sLx6N+Yf98lYutCOlIQQQWA201QHhdx/P2DysymDgqWFR3RGWshz1
igk13ajEW+8CRDvJdpcM0EuVpHzoqtirA/41f2wWF1V4izoDQJ9f5BtT+Jtbpw3P5rYAp7+vZÁOizOsyey5yzY
Dt87FimAPUEN+OzDZ7EoawxBJFBjZsAPhKLnw+FqBbFS8xRHaj+0XkBjeB+0oSkF0dZmQfA==

Arenal No. 550, Piso 1, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
(55)53340700 www.gob.mx/impi



22

348455



UN NUEVO PÉPTIDO ANALGÉSICO PROVENIENTE DEL VENENO DE LA ARAÑA *BRACHYPELMA VERDEZY*

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un nuevo péptido con actividad analgésica, particularmente en mamíferos. Dicho péptido fue aislado y purificado a partir del veneno de la araña *Brachypelma verdezy*, pero también puede ser obtenido por otros medios como síntesis química, o bien mediante la técnica del ADN recombinante. El péptido denominado en la presente invención como BvTx47

10 (SEQ ID NO: 1) es de estructura beta DDH (direct disulfide hairpin por sus siglas en inglés, o también denominado, rizo guiado por disulfuros), el cual es diferente a los otros péptidos analgésicos reportados de estructura de nudos de cisteínas, como el grupo de las ICK (inhibitor cysteine knot, por sus siglas en inglés, o también denominado, nudo inhibidor de cisteínas).

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Dolor y analgesia

El dolor es una experiencia sensorial y emocional, generalmente desagradable,

20 asociada a un daño real o potencial del tejido que pueden experimentar todos aquellos seres vivos que disponen de un sistema nervioso. Es una experiencia asociada a una lesión tisular y es un mecanismo que utiliza nuestro organismo para alertarnos acerca de lo que sucede en nuestro alrededor, el tratar de dar una escala de medida exacta al dolor, es prácticamente imposible, ya que se

25 trata de una sensación subjetiva (Buschmann et al., 2002) y debido a esta alta variabilidad, podemos clasificar el dolor de tipo agudo o crónico (García-Fajardo et al., 2010).

El dolor de tipo agudo es una experiencia que usualmente es de corta duración y sirve para alertar al organismo acerca de un daño tisular, que al ser percibido

30 por el individuo este toma las medidas protectoras o evasivas necesarias para

2



minimizar el daño. Este tipo de dolor tiende a disminuir conforme pasa el tiempo (McGivern, 2007).

Mientras que el dolor de tipo crónico representa una señal anormal que es de amplia duración y aparentemente no tiene ningún uso funcional para un organismo, pero es asociado normalmente con enfermedades que presentan inflamación de tejidos o daño a neuronas del sistema nervioso central (CNS) o del sistema nervioso periférico (PNS), en algunos de los casos más complejos el dolor crónico puede deberse a una combinación de dolor por inflamación y dolor neuropático (McGivern, 2007).

10 A pesar de que a partir de la década de los 60's se han realizado grandes avances en el estudio del dolor, los tratamientos existentes contra éste no son totalmente eficaces para todos los casos, ya que existen algunos donde el dolor aún no es tratable (Buschmann et al., 2002). Incluso hay algunos padecimientos que siguen siendo manejados de manera equivocada usando medicamentos que

15 ya no son de uso común, los cuales tienen un gran número de efectos secundarios y no una acción específica tales como algunas fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Villarejo-Díaz, 2001). Al existir dolor como parte de una sintomatología, el tratamiento general refiere al uso de analgésicos tanto opioides como los fármacos AINES los cuales son administrados principalmente de manera oral o intradérmica. Por definición general los analgésicos son

20 medicamentos utilizados para calmar, tratar y aliviar el dolor (Buschmann et al., 2002). Los medicamentos para el control del dolor se diseñaron para interrumpir las vías de transmisión en sitios específicos, usualmente bloqueando la transmisión de señales. Existen tres sitios principales donde se puede modificar

25 la señal transmisora del dolor, esto puede ocurrir en la periferia, en la médula espinal y en el cerebro. La mayoría de los analgésicos tienen más de un solo sitio de acción. En la espina dorsal la información dolorosa se percibe por medio de células del ganglio dorsal de donde son enviados al cerebro. Las fibras que transmiten estas señales al cerebro tienen terminaciones en diferentes sitios, particularmente la formación reticular, el tálamo y la corteza cerebral. En

30 la formación reticular el estímulo doloroso puede provocar cambios en el ritmo

3



cardíaco, la presión sanguínea, la respiración y otras funciones. Mientras que en el tálamo y la corteza cerebral es donde se genera la apreciación consciente del dolor.

Los analgésicos opioides entre los cuales se cuentan algunos de los más potentes actualmente son utilizados para tratar dolores de moderados a severos, sin embargo provocan una serie de efectos secundarios, entre los que se encuentran la generación de resistencia y en ocasiones y como consecuencia de ello se puede generar una farmacodependencia en el paciente. Uno de los analgésicos opioides más conocido es la morfina, la cual aparte de acarrear consigo la fama de narcótico es el estándar contra el cual son comparados los nuevos analgésicos (Schmalhofer et al., 2008).

Mientras que los AINES tienen un grado variable de acción analgésica, antiinflamatoria y anti-pirética, su acción analgésica se encuentra mediada principalmente por su capacidad de prevenir la producción de prostaglandinas, las cuales se encuentran implicadas en la producción de dolor inflamatorio y en la sensibilización de nociceptores. Los AINES producen una serie de efectos secundarios como los daños gastrointestinales y la nefrotoxicidad, entre otros, ya afectan distintos órganos (Buschmann et al., 2002).

20 Péptidos analgésicos provenientes de animales ponzoñosos

En la actualidad el uso de analgésicos sigue siendo en su mayoría similar al mismo que existía hace ya varias décadas (Livett et al., 2006). Sin embargo en la búsqueda de nuevos fármacos contra el dolor se ha llegado a encontrar moléculas analgésicas en venenos de animales, tal es el caso de los conos marinos (Livett et al., 2006). Estos moluscos producen un veneno bastante complejo el cual puede llegar a contener hasta 200 componentes distintos biológicamente activos (Buschmann et al., 2002).

La búsqueda de analgésicos en venenos de animales tiene como base conocimientos previos (mas no es la única razón), sobre la sintomatología provocada por éstos venenos en el ser humano, la cual podría estar relacionada con una actividad analgésica. Esta búsqueda ha dado como resultado el descubrimiento

4



de péptidos con propiedades analgésicas en distintos organismos (Zhang et al., 2007).

Uno de los mejores resultados obtenidos hasta el momento es el fármaco llamado Prialt®, que es el nombre comercial de la Conotoxina MVIIA (que pertenece a una familia de Conopéptidos que tienen un tamaño de entre 24 y 29 aminoácidos). La Conotoxina MVIIA se obtuvo del veneno del caracol marino denominado *Conus magus* y su acción analgésica se basa en el bloqueo de canales de calcio del tipo N. Este péptido completó satisfactoriamente sus fases de pruebas clínicas y fue aprobado por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés) para su uso terapéutico. En la actualidad el Prialt® es utilizado en el tratamiento del dolor crónico, teniendo varias ventajas sobre los tratamientos tradicionales, ya que no se ha observado que provoque algún efecto secundario siempre y cuando se administre vía epidural, lo cual es una limitante de este fármaco (McGivern, 2007).

El descubrimiento de la actividad analgésica de la Conotoxina MVIIA ha sido un aliciente en la investigación que se lleva a cabo en el estudio de venenos provenientes de animales ponzoñosos. Posteriormente se han encontrado péptidos con acción antinociceptiva en varias especies de animales venenosos, entre ellos en venenos de arañas.

20

Analgésicos en venenos de arañas

Los estudios llevados a cabo en el veneno de conos marinos han llevado a varios grupos científicos a buscar péptidos analgésicos en otros organismos, tales como en el veneno de las arañas y en el caso de este trabajo arañas de la familia *Theraphosidae*, mejor conocidas como tarántulas.

El término tarántula no siempre es aplicado de la manera correcta y en ocasiones se utiliza para designar de manera indistinta a otras arañas con vellosidades y algunas arañas lobo de gran tamaño al sur de Europa (*Lycosa sp.*, *Lycosidae*). Sin embargo este término solo denota a las cerca de 860 especies que forman la familia *Theraphosidae*, representando estas un pequeño número del total de 37,972 especies de arañas reconocidas a la fecha (The World Spider Catalog,

5



V11.0 by N. I. Platnick © 2000 — 2010). Las tarántulas se encuentran distribuidas en una gran diversidad de ecosistemas lo cual correlaciona con la gran diversidad de moléculas en sus venenos. Al igual que otras arañas estas son depredadoras, las cuales además de depender de su fuerza, deben contar con venenos altamente eficientes que les permiten lidiar con sus presas entre las cuales se incluyen algunos vertebrados a los cuales paralizan, lo cual hace de estos venenos fuentes interesantes de moléculas para el estudio de receptores celulares y canales iónicos en vertebrados.

Los venenos de tarántula representan una gran fuente de nuevos ligandos para una variedad de receptores, ya que la diversidad de toxinas peptídicas en estos venenos ha sido vagamente explorada. De las cerca de 860 especies de tarántulas conocidas solo se han hecho estudios hasta ahora con el veneno de 55 de estas especies (Rash y Hodgson, 2002).

Las primeras investigaciones con el veneno o toxinas de algún animal se llevaron a cabo como consecuencia de los efectos dañinos de estos sobre el ser humano pero teniendo como mira el desarrollo de tratamientos. Estos estudios demostraron entre otras cosas que las toxinas presentes en dichos venenos tienen una gran actividad biológica. Al ser aislados de sus venenos, estas moléculas pueden revelar mucho acerca de los procesos fisiológicos con los cuales interfieren.

Los reportes de toxicidad del veneno de tarántula son aislados y en la mayoría de los casos son hechos anecdóticos, si bien existen reportes médicos sobre mordeduras de terafósidos, la mayoría de ellos se remiten al hecho de que producen dolor de mediano a severo cerca de la zona de la mordida, escozor, edemas, eritemas, dolor articular, entre otros (Schanbacher et al., 1973; Chan et al., 1975). Los únicos casos donde se han presentado problemas más severos es en el caso de algunas especies europeas, del subcontinente indio, entre otras, principalmente especies con costumbres arborícolas, la sintomatología puede llegar a ser tan grave como para provocar un arresto cardíaco. En el caso de Australia se han reportado 7 mordeduras fatales en perros (Isbister, 2003).

6



En estudios de toxicidad en ratones se ha observado que los efectos letales se observan mejor tras una inoculación ICV (intracerebroventricular), que utilizando cualquier otra vía de entrada. En una serie de pruebas realizadas con el veneno de 55 especies de tarántulas distintas se observó que todos los venenos de especies asiáticas y africanas (a excepción de una) inducen la muerte en menos de 20 minutos de un ratón de 20 g con 0.1 µL de veneno crudo vía ICV. Llegándose en algunos casos hasta el extremo de que el ratón muriese a los pocos segundos de inyectado el veneno. Los principales géneros con estas características son *Helenoscodra*, *Stromatopelma* y *Poecilotheria*. La acción tan rápida de algunos de estos venenos nos hace pensar en una posibilidad de evolución convergente, debido a la presencia de péptidos con características similares en otros venenos de rápida acción como el de los conos marinos (Rash y Hodgson, 2002).

La purificación de estos venenos de manera eficiente no se logró sino hasta el advenimiento de técnicas de separación como el HPLC, espectrometría de masas y secuenciación automatizada de Edman (Edman, 1950). Se han llevado a cabo varios estudios con el veneno de distintas especies de araña y hasta el momento se han encontrado varias moléculas con potencial analgésico, que son:

La psalmotoxina-1 (PcTx1), la cual es un péptido extraído de la tarántula sudamericana *Psalmopeus cambridgei* que tiene un gran potencial analgésico en contra de dolor termal, mecánico, químico, inflamatorio y neuropático en roedores. Su acción radica en bloquear canales iónicos ácido-sensibles Ia (ASIC1a), este bloqueo resulta en la activación de un vía endógena de encefalinas (Mazzuca et al., 2007). La Pro-TxII es un péptido bloqueador, de 30 aminoácidos, que actúa de manera selectiva en canales activados por sodio $Na_v 1.7$, que es un contribuidor esencial en la transmisión del dolor, este péptido es altamente selectivo por este subtipo de canales y se encuentra presente en el veneno de la tarántula *Thrixopelma pruriens* (Schmalhofer et al., 2008). La Huwentoxina-1 es un bloqueador de canales de calcio del tipo N proveniente del veneno de la tarántula *Ornithoctonus huwena* el cual durante sus estudios

7



se comparó con la Conotoxina- MVIIA y la morfina en ensayos de formalina en ratas consientes dando muy buenos resultados (Chen et al., 2005). La Agatoxina IVA es un péptido que actúa como bloqueador de canales de calcio de tipo P y se encontró en el veneno de la araña de embudo americana *Agelenopsis aperta*. Se ha observado que la Agatoxina IVA tiene un efecto sinérgico con la morfina y clonidina (Roerig y Howse, 1996). El péptido GsMTx4 proviene del veneno de la tarántula *Grammostela spatulata* que aunque no se sabe aún cuál es su mecanismo de antinocicepción, parece aliviar la hiperalgesia mecánica inducida por inflamación bloqueando canales mecanosensitivos (Park et al., 2008). El Phalβ es un péptido que se encuentra en el veneno de la araña *Phoneutria nigriventer*, el cual tiene un gran potencial analgésico como bloqueador de canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v). Después de varios estudios se ha encontrado que su acción analgésica está ligada a la liberación provocada por Ca²⁺ del neurotransmisor pro-nociceptivo glutamato de los sinaptosomas de la médula espinal de la rata, disminuyendo así su cantidad en el fluido cerebroespinal (Souza et al., 2008).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1.** Gráfica que muestra la separación por cromatografía semipreparativa de fase reversa del veneno de *Brachypelma verdezy*. La fracción marcada con la flecha presentó un efecto analgésico en ratones macho cepa CD-1 y se denominó FrBv47 ya que representa la fracción protéica que eluyó al minuto 47.
- Figura 2.** Gráfica que muestra la separación por cromatografía analítica de fase reversa de la fracción FrBv47 del veneno de *Brachypelma verdezy*. Esta figura corresponde a una segunda etapa de purificación por HPLC. La fracción marcada con la flecha presentó el efecto analgésico en ratones macho cepa CD-1 y se denominó BvTx47 ya que representa un péptido puro con actividad analgésica proveniente de la fracción FrBv47.
- Figura 3.** Tabla que muestra la secuencia de aminoácidos del péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1).

8



- Figura 4.** Tabla que muestra la comparación del péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) con otros péptidos analgésicos reportados en la literatura.
- Figura 5.** Gráfica que muestra la actividad analgésica por Hot Plate de la fracción FrBv47 y BvTx47 (SEQ ID NO: 1) en ratones macho cepa CD-1.
- Figura 6.** Gráfica que muestra la actividad analgésica por ensayo de formalina de la fracción BvTx47 (SEQ ID NO: 1) en ratones macho cepa CD-1.
- Figura 7.** Imagen que muestra el modelo estructural de BvTx47 basado en la estructura del péptido Ba1 PDB 2KGGH. La figura en color gris claro fue generada usando el software EsyPred y la figura en color gris oscuro es el modelo tridimensional del péptido insecticida Ba1 depositado en el PDB con el número de acceso 2KGGH. Mientras que los residuos resaltados en gris claro denotan tanto la adición así como las mutaciones presentes en BvTx47 con respecto a Ba1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se puede constatar en el estado del arte, si bien existe una amplia gama de analgésicos, muchos de ellos presentan el inconveniente de efectos secundarios, por ejemplo la morfina crea dependencia y el analgésico Prial® debe ser administrado epiduralmente ya que administrado intravenosamente crea un estado de movimientos incontrolados en el paciente. Por ello persiste la necesidad de continuar generando nuevos analgésicos, particularmente de origen peptídico, que potencialmente puedan presentar menos efectos secundarios. Los analgésicos de origen peptídico, existen de muy variadas estructuras: péptidos sin puentes disulfuro o aquellos con puentes disulfuro. Hasta ahora existen pocos reportes en la literatura sobre la presencia de analgésicos en el veneno de arañas que hayan sido probados experimentalmente *in vivo*. Particularmente en la presente invención se aborda el aislamiento de un nuevo péptido analgésico a partir del veneno de la araña *Brachypelma verdezy*, el cual administrado vía parenteral genera un estado analgésico sin observarse efectos secundarios en un lapso de 48 horas, pues los ratones tratados se comportaron durante 48 horas de

9



manera similar a los ratones control. Los inventores de la presente invención aportan como propuesta el uso del péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1), un péptido aislado y purificado que presenta una secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, la cual es diferente a las secuencias de otros péptidos, incluyendo aquellos con actividad analgésica, ya reportados.

Inicialmente este péptido fue obtenido por aislamiento y purificación a partir del veneno de la araña *Brachypelma verdezy* (**Figura 1**), que puede ser colectado en el estado de Morelos, México, por lo que se ha resuelto llamarlo BvTx47 (SEQ ID NO: 1) ya que la molécula más representativa de la fracción 47 resultó con actividad analgésica (**Figura 2**).

El veneno de la araña, *Brachypelma verdezy*, puede ser obtenido por estimulación eléctrica de los quelíceros o cualquier otro método conocido en el estado del arte (Corzo et al., 2008). El veneno es recuperado en agua bidestilada y centrifugado a 4 °C. El sobrenadante es liofilizado y conservado a -20 °C, hasta su uso. La separación y purificación de los componentes solubles del veneno se lleva a cabo por un método cromatográfico conocido en el estado del arte como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o bien cualquier otro tipo de método cromatográfico conocido en estado del arte (Mant y Hodges, 1991).

De las fracciones obtenidas, se pueden continuar subsecuentes etapas de purificación de aquellas que presenten actividad analgésica en los animales modelos preseleccionados. Se pueden emplear los diferentes métodos cromatográficos conocidos en estado del arte como los antes mencionados, y con tantas etapas como sea necesario hasta obtener un compuesto único y puro en forma de su correspondiente sal. Para la caracterización química del péptido se determina su composición química, la cual se lleva a cabo mediante un análisis de aminoácidos del N-terminal del péptido, por ejemplo en un secuenciador automatizado LF3000 (Beckman, CA, USA) de secuenciación de péptidos (degradación de Edman) en membranas de unión covalente Sequelon-AAR siguiendo los protocolos descritos por la compañía. El peso molecular de la fracción con actividad analgésica se estimó por espectrometría de masas. La masa molecular del péptido con actividad analgésica fue determinada mediante ionización por elec-

10



troscopy (ESI-MS) usando un equipo Finnigan LCQDUO ion trap (San José, CA, USA). La cuantificación del contenido de proteína durante los procedimientos cromatográficos se calcula asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm equivale a 1 mg/ml de proteína (Aitken y Learmonth, 2002).

Para el secuenciamiento del N-terminal o determinación de espectrometría de masas se usó el péptido nativo para secuencia directa, así como los oligonucleótidos diseñados a partir del N-terminal y utilizados para extraer el transcrito de RNA mensajero a partir de las glándulas venenosas de la araña *Brachypelma verdezy* mediante la técnica de RACE-PCR. El péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) resulta tener una secuencia aminoacídica diferente a otros péptidos de terafósidos (**Figura 3**).

El nuevo péptido analgésico BvTx47 (SEQ ID NO: 1) de la presente invención tiene un peso molecular teórico de 4,559.6 Da, un punto isoeléctrico calculado de 9.3 y presenta una estructura tipo beta en su estructura secundaria.

Las búsquedas en bancos de datos conteniendo secuencias aminoacídicas de proteínas mostraron alta identidad con los péptidos insecticidas Ba1 y Ba2 provenientes del veneno de la araña *Brachypelma albiceps* (97%); con el péptido Bsl provenientes del veneno de la araña *Brachypelma smithi* (89%), con el péptido Aspl1 (92%) proveniente del veneno de la araña *Euripelma californicum* y con los péptidos 3 y 8 provenientes del veneno de la araña *Aphonopelma sp.* (82%) (**Figura 4**). El alineamiento y las comparaciones de las secuencias de aminoácidos se realizaron con el programa Clustal X. Al comparar el péptido analgésico BvTx47 (SEQ ID NO: 1) con el péptido Ba1 (**Figura 4**), se identifican 37 de los 40 aminoácidos generados, obteniéndose una identidad de 97%. Estos valores de identidad demuestran una pequeña diferencia entre el péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) y los péptidos conocidos, mismos que no están reportados como analgésicos si no como péptidos insecticidas. Como se observa en la figura 4 el nuevo péptido BvTx47 descrito en la presente invención tiene la característica única de presentar un aminoácido más que las toxinas con mayor identidad, que es una treonina (T) al inicio de la cadena aminoacídica. Asimismo, presenta otra diferencia que es el tener una metionina (M) en la posi-

11



ción 36 en lugar de la leucina (L) o la fenilalanina (F), presentes en las otras toxinas con alta identidad (**Figura 4**). De este modo ~~BvTx47 (SEQ ID NO: 1)~~ es un nuevo péptido que, si bien presenta cierta identidad con péptidos que han sido reportados como insecticidas (mas no como analgésicos), presenta un efecto analgésico.

El péptido BvTx47 se diferencia de los trabajos reportados en la patente internacional WO94/10196 principalmente en que los péptidos que describe tienen una secuencia diferente (identidad no mayor a 90 %) y que los péptidos que ésta protege son péptidos de la araña *Theraposidae aphonopelma* y no de la araña *Brachypelma verdezy* como lo es el péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1). Los péptidos con alta identidad a BvTx47 no han sido reportados con actividad analgésica contra el dolor crónico o agudo, como el nuevo péptido BvTx47 de la presente invención, que fue evaluado como analgésico mediante el ensayo de Hot Plate, el cual mide la respuesta a un dolor agudo como es el calor (**Figura 5**) y mediante el ensayo de Formalina, en el cual en un periodo de 5 a 20 minutos posterior a la inoculación del analgésico se mide el dolor agudo como parte de una reacción química por la introducción de formaldehído en una de las extremidades del animal modelo. Posteriormente, en este mismo ensayo se mide el dolor crónico en un periodo de 20 a 40 minutos como respuesta al dolor químico de la reacción continua del formaldehído con proteínas propias del tejido que recibió la inoculación del formaldehído (**Figura 6**).

La estructura secundaria para el péptido analgésico BvTx47 (SEQ ID NO: 1) es de hojas beta como es observada en la homología con la estructura resuelta del péptido Ba1 (**Figura 7**). Con el objeto de demostrar que la actividad biológica del péptido analgésico BvTx47 (SEQ ID NO: 1) no es debida a la presencia de algún posible contaminante en la muestra, purificada a partir del veneno de la araña, y que es factible obtener el péptido analgésico BvTx47 (SEQ ID NO: 1) por métodos distintos al aislamiento y purificación a partir del veneno, se procedió a sintetizar la molécula completa del péptido analgésico BvTx47 (SEQ ID NO: 1) por un método químico. Por ejemplo el descrito por los inventores en la patente norteamericana 4,929,718, haciendo una síntesis de novo de la

12



molécula BvTx47 (SEQ ID NO: 1). Sin embargo es obvio para cualquier experto en el estado del arte que, con la secuencia SEQ ID NO:2 del ADN, el péptido analgésico BvTx47 de la presente invención puede también ser obtenido por otros métodos conocidos como los métodos del ADN recombinante.

El hallazgo del péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) en el veneno de la araña *Brachypelma verdezy*, su aislamiento, síntesis y demostración de su actividad analgésica constituye un nueva invención, distinta de lo encontrado en los venenos de las arañas mencionadas en la literatura, los cuales contienen particularmente péptidos insecticidas. Además, el péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) se diferencia de otros péptidos analgésicos provenientes del veneno de arañas en que el péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) es el único que contiene 40 residuos de aminoácidos con una secuencia diferente, la cual es idéntica en un 97 % a un péptido insecticida proveniente del veneno de la araña *Brachypelma albiceps* (Corzo et al., 2009).

Es obvio para cualquier experto en el estado del arte que el péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1), de la presente invención, tiene un potencial uso farmacéutico o veterinario como analgésico, sin embargo son posibles posteriores hallazgos respecto a otros nuevos usos o aplicaciones que pueda tener, sobre todo atendiendo a que su origen esté en un veneno de araña, a diferencia de la gran mayoría de otros péptidos encontrados en el estado del arte, cuyo origen son las respuestas defensivas contra insectos y otros animales.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas con efecto analgésico que comprendan al péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) de la presente invención. En tales composiciones el péptido puede estar presente como único principio activo o acompañado de otros principios activos tales como: el acetaminofén o antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina, el naproxeno y el ibuprofén, o bien de analgésicos narcóticos ya sean agonistas puros como la morfina, la codeína, la metadona, la meperidina, el fentanil, el tramadol; o agonistas parciales o agonistas-antagonistas, tales como la buprenorfina y la nalbufina; o bien antagonistas puros como la naxolona.

Típicamente el péptido de la presente invención podrá estar en concentraciones

13



que van del 0.1% al 99%, siempre en una cantidad farmacológicamente efectiva, que depende de varios factores. Entre estos factores se incluyen cantidades de los otros ingredientes en caso de emplearse y tolerancia del ingrediente activo del compuesto. La cantidad efectiva del ingrediente activo suele variar desde alrededor de 8% hasta casi 35% por peso, con base en el peso total de la composición.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden adicionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, es decir sólidos o líquidos de relleno, diluyentes o sustancia que pueden usarse con seguridad en administración sistémica o tópica. Según la vía particular de administración son farmacéuticamente aceptables varios vehículos bien conocidos en la industria e incluyen sólidos o líquidos de relleno, diluyentes, hidrotropos, agentes tensoactivos y sustancias encapsulantes. La cantidad de vehículo empleada junto con el péptido analgésico de la presente invención suministra una cantidad manejable de material por dosis unitaria del péptido.

Vehículos farmacéuticamente aceptables para administración sistémica que pueden incorporarse en la composición de la invención incluyen azúcar, féculas, celulosa, aceites vegetales, amortiguadores, polioles y ácido algínico. Vehículos específicos farmacéuticamente aceptables se describen en los siguientes documentos, todos ellos incorporados aquí como referencia: U.S. 4,401,663, Buckwalter et al. emitido en Agosto 30, 1983; European Patent Application No. 089710, LaHann et al. publicado Sept. 28, 1983; y European Patent Application No. 0068592, Buckwalter et al. publicado Enero. 5, 1983. Los vehículos preferidos para administración parenteral incluyen propilenglicol, pirrolidona, oleato de etilo, etanol acuoso y combinaciones de estos.

Vehículos representativos incluyen acacia, agar, alginatos, hidroxialquilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, carragenina, celulosa en polvo, goma guar, colesterol, gelatina, goma agar, goma arábica, goma karaya, goma ghatti, goma de frijol locust, octoxinol 9, alcohol oleil, pectina, ácido poliacrílico y sus homólogos, polietilenglicol, alcohol polivinílico, poliacrilamida, lauril sulfato sódico, óxido polietilénico,

14



polivinilpirrolidona, glicol monoestearato, propilenglicol monoestearato, goma xantana, tragacanto, ésteres sorbitan, alcohol esteárico, fécula y sus modificaciones.

5 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son dados para ilustrar algunos de los modos para obtener o utilizar la presente invención. Es posible llevar a cabo muchas variaciones de los mismos sin salirse del alcance de la presente invención y por lo tanto de ninguna manera debería considerarse que la limitan de alguna forma los alcances de la presente invención.

Ejemplo 1. Aislamiento y purificación de BvTx47 (SEQ ID NO: 1) a partir del veneno de la araña *Brachypelma verdezy*.

El veneno crudo de *Brachypelma verdezy* se obtuvo por estimulación eléctrica de los quelíceros de las arañas colectadas en el Estado de Morelos, México. El veneno se recuperó en agua bidestilada y se centrifugó en una ultracentrifuga Beckman OptimaTL por 15 minutos, a 4 °C y 15,000 g de aceleración. El sobrenadante se liofilizó y conservó a -20 °C, hasta su uso.

La purificación de los componentes solubles del veneno se llevó a cabo primeramente por cromatografía de alta presión. El veneno liofilizado se disolvió en una solución acuosa con 0.1% de TFA, y se aplicó directamente a la columna, obteniéndose el perfil mostrado en la figura 1. En esta separación se obtuvieron 60 fracciones, numeradas del 1 al 60, colectándose en tubos de 1.5 ml y agrupándose de acuerdo a la absorbancia (leída a 280 nm). La recuperación total fue del 85%, del cual aproximadamente el 1 % corresponde a la fracción denominada FrBv47, la cual presentó un efecto analgésico en ratones cepa CD-1 machos (seleccionados como animales modelo), a las concentraciones utilizadas (14 µg/20 g de peso de ratón por ensayo).

Soluciones posteriores del material de la fracción FrBv47 (con el péptido BvTx47, SEQ ID NO: 1), en cantidades de alrededor de 200 microgramos por aplicación, fueron purificadas por cromatografía líquida de alta resolución

15



(HPLC), utilizando una columna (Vydac) C₁₈ analítica, en un aparato Waters 600E equipado con un detector de UV, modelo Waters-486, con un gradiente lineal de 20 a 60% de acetonitrilo, en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), durante 40 minutos, resultando el perfil cromatográfico de la figura 2. Más de tres subfracciones fueron obtenidas como se puede observar en la figura 2, en donde el componente marcado con la flecha (péptido BvTx47, SEQ ID NO: 1) mostró actividad analgésica contra las cepas de ratones CD-1 machos. Este péptido corresponde aproximadamente al 1 % del veneno total y fue sometido a un análisis de espectrometría de masas donde se demostró estar homogéneo y con un peso molecular de 4,559.6 Da determinado por la técnica de electrospray.

Ejemplo 2. Obtención de secuencia de BvTx47 (SEQ ID NO: 1).

Los primeros 24 aminoácidos de la secuencia N-terminal del péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) fueron obtenidos mediante la degradación de Edman (Edman, 1950). Los aminoácidos restantes fueron obtenidos mediante el procedimiento de RACE-PCR el cual inicia con una retro-transcripción del material genético de la araña utilizando 10 µL del RNA de glándula de veneno de araña y 2 µL del oligonucleótido ADAP3 (SEQ ID NO: 3). Estos se mezclan y se incuban por 10 minutos a 70 °C, dejando reposar la mezcla un minuto en hielo para agregar posteriormente 2 µL de buffer de PCR, 2 µL de DTT 20 mM, 2 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos 10 mM y 2 µL de MgCl₂ 25 mM. Esta mezcla se incuba por 5 minutos a 42 °C y posteriormente se agrega 1 µL de retrotranscriptasa. Al ser agregada la retrotranscriptasa se deja incubando toda la mezcla por 50 minutos a 42 °C.

Al terminar lo anterior, se prepara una primera reacción de PCR con los siguientes reactivos: 5 µL Buffer de PCR 10X, 3.5 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos, 1.5 µL del oligonucleótido llamado "Outer" (SEQ ID NO: 4), 1.5 µL del oligonucleótido llamado "47FW" (SEQ ID NO: 5), 1 µL de Taq polimerasa y 36.5 µL de agua. Para esta primera reacción de PCR se utilizan las siguientes condiciones en un termociclador: Tiempos pre-PCR; 94 °C por 15

16



segundos, 50 °C por 1 minuto 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Treinta ciclos; 94 °C por 15 segundos, 53 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos. Tiempos finales; 72 °C por 7 minutos y 4 °C por 2 minutos. Finalizada la primera reacción de PCR se llevó a cabo una segunda reacción de PCR, para el cual se utilizan las siguientes condiciones: 5 µL Buffer de PCR 10X, 3.5 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos, 1.5 µL oligonucleótido llamado "Inner" (SEQ ID NO: 6), 1.5 µL de oligonucleótido llamado "47FW" (SEQ ID NO: 5), 1 µL de Taq polimerasa y 36.5 µL de agua. La mezcla de reacción se incubaba con el siguiente programa en el termociclador: Tiempos pre-PCR; 94 °C por 15 segundos, 50 °C por 1 minuto 30 segundos, 72 °C por 30 segundos. Treinta ciclos; 94 °C por 15 segundos, 53 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos. Tiempos finales; 72 °C por 7 minutos, 4 °C por 2 minutos. Al terminar la segunda reacción de PCR se toman 3 µL muestra para observarla en un gel de agarosa 1.5% para comprobar la existencia de bandas enriquecidas en el peso molecular esperado.

El material genético enriquecido y obtenido con estas dos reacciones de PCR se clona en un vector TOPO 2.1 siguiendo las instrucciones del proveedor.

Posteriormente se extrae el plásmido mediante el kit de purificación de Roche "High pure plasmid isolation kit". Al finalizar el protocolo se preparan reacciones de PCR para secuenciar el material genético obtenido, utilizándose los siguientes reactivos: 15 µL de plásmido y 1 µL de oligonucleótido M13 Forward (SEQ ID NO: 7).

La secuencia completa obtenida por estos métodos para el péptido BvTx47, es la que se reporta en la SEQ. ID. No: 1

Ejemplo 3. El ensayo de "Hot-Plate"

El ensayo de "Hot-Plate" en la presente invención fue con ratones machos cepa CD1 con un peso aproximado de 20 gramos. Para llevar a cabo la prueba de "Hot-Plate", primero se aclimataron los ratones en el área donde se realizó la prueba, durante treinta minutos previos al ensayo. La hora de la inyección se

17



mantuvo constante, en un periodo de las 19:00 a las 20:00 horas (Espejo y Mir, 1993).

Posteriormente se inyectó el fármaco o fracción de veneno utilizado en el ratón por vía intraperitoneal, a una concentración de 0.7 µg péptido/g ratón, diluido en buffer de fosfatos salino (PBS) con pH 7.4, dejando pasar un tiempo de 30 ó 45 minutos después de la inyección antes de medir su acción analgésica.

Una vez transcurridos los 30 o 45 minutos, los ratones, individualmente, se colocaron sobre el aparato llamado “Hot-Plate” (Panlab s.l., LE7406), el cual se compone de una placa metálica (diámetro de 25.4 cm) a una temperatura constante de 55°C. El ratón se coloca sobre la placa metálica y se mide su tiempo de latencia, el cual es el tiempo que transcurre hasta observar una respuesta al dolor a partir de un estímulo térmico, dicha respuesta puede ser el lamerse las extremidades (anteriores o posteriores) o el salto (cualquiera que ocurriese primero). Cuando un ratón no generó una respuesta en un lapso mayor a 30 segundos, esto es, no mostró respuesta al dolor, se dio por terminada la prueba y el tiempo de latencia que se reportó fue de 30 s. Cada ratón se utilizó una sola ocasión y se realizaron al menos tres pruebas independientes. Posteriormente se realizó un análisis estadístico por medio del análisis de diferencias significativas (Malmberg y Yaksh, 1994). Como puede observarse en la figura 5 los tiempos de latencia del péptido BvTx47 son mayores que el control negativo (solo solución amortiguadora) y que los controles positivos, los analgésicos Lidocaína, Nalbufina y Acetaminofén. Estos resultados demuestran la actividad analgésica del péptido BvTx47 en el ensayo de dolor agudo.

25 Ejemplo 4. Ensayos de formalina

Esta prueba se usa principalmente en casos de dolor persistente con daño a tejido, para lo cual se hace uso de la formalina (en una solución diluida de formaldehído), que tras ser inyectada en una de las extremidades traseras del animal modelo produce un dolor continuo. El dolor provocado por la formalina se divide en 2 fases temporales, las cuales pueden variar entre los modelos usados (ratones o ratas) y entre individuos. La fase aguda se presenta durante un pe-

18



riodo del minuto 5 al 20 de haber sido inyectada la formalina y la fase crónica durante un periodo del minuto 20 al 40. En este ensayo la medida de la acción de una sustancia analgésica se basa en las muestras o señales de dolor que muestre el individuo durante estos periodos de tiempo. El análisis estadístico de los datos obtenidos se lleva a cabo por comparación de las medias y análisis de varianza y diferencias significativas (Abbott et al., 1999). El ensayo de formalina en este trabajo fue con ratones machos CD1 con un peso aproximado de 20 gramos. Inicialmente se marcaron los animales en la extremidad a inyectar (trasera derecha) y se mantuvieron en el contenedor por 30 minutos para que los animales se aclimataran a su entorno. Pasados los 30 minutos las soluciones de analgésicos control o péptidos se inyectaron intraperitonealmente 15 minutos antes de inyectar la formalina en la extremidad marcada, a una concentración de 0.7 µg péptido/g ratón, diluido en buffer de fosfatos salino (PBS) con pH 7.4. La solución de formalina (50 microlitros al 5% de Formalina, según Chen *et al.* 2005) se inyecta de manera subcutánea en la mitad de la cara plantar (esto es para poder observar cuando se lame la pata). La observación de la primera fase se realizó del minuto 0 al 20 y la observación de la segunda fase fue entre los minutos 20 y 40. La respuesta al estímulo son las veces en que el ratón se lame la pata inyectada durante un minuto, cada cinco minutos hasta el término de la prueba. Como puede observarse en la figura 6 los tiempos de latencia del péptido BvTx47 son menores que el control negativo (solo solución amortiguadora) y comparables al control positivo de lidocaína, pero más eficaz que el ketorolac en el periodo de dolor agudo. Estos resultados demuestran la actividad analgésica del péptido BvTx47 en el ensayo de dolor agudo y su eficacia comparable a la lidocaína y el ketorolac en el dolor crónico.



REFERENCIAS

- Abbott, F. V., Ocvirk, R., Najafee, R., Franklin, K. B., 1999. Improving the efficiency of the formalin test. *Pain* 83, 561-569.
- 5 Aitken, A., Learmonth, M. (2002). Protein Determination by UV absorption. *The protein protocols handbook*. J. M. Walker. New Jersey, USA, Humana Press: 3-7.
- Buschmann, H., Christoph, T., Friderichs, E., Maul, C., Sundermann, B. and Ed, J. L. (2002). *Analgesics : from chemistry and pharmacology to clinical application*.
- 10 Chan, T. K., Geren, C. R., Howell, D. E. y Odell, G. V., 1975. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. *Toxicon* 13, 61-66.
- Chen, J. Q., Zhang, Y. Q., Dai, J., Luo, Z. M. y Liang, S. P., 2005. Antinociceptive effects of intrathecally administered huwentoxin-I, a selective N-type calcium channel blocker, in the formalin test in conscious rats. *Toxicon* 45, 15-20.
- 15 Corzo, G., Bernard, C., Clement, H., Villegas, E., Bosmans, F., Tytgat, J., Possani, L. D., Darbon, H. y Alagón, A., 2009. Insecticidal peptides from the therapsid spider *Brachypelma albiceps*: An NMR-based model of Ba. *BBA - Proteins and Proteomics* 1794, 1190-1196.
- 20 Corzo, G., Diego-Garcia, E., Clement, H., Peigneur, S., George, O., Tytgat, J., Possani, L. D. y Alagón, A., 2008. An insecticidal peptide from the therapsid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features among spider species from different genera. *Peptides* 29, 1901-1908.
- 25 Edman, P., 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283-293.
- Espejo, E. F. y Mir, D., 1993. Structure of the rat's behaviour in the hot plate test. *Behaviour. Brain Res.* 56, 171-176.
- 30 Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L. D. y Corzo, G., 2011. Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of a mammalian scorpion peptide toxin improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides* 32, 75-79.
- García-Fajardo, L. E., Martínez-Linares, M. P. y González-Olaya, H. L., 2010. Inflamación y dolor: Cambios en el sistema nervioso periférico y central. *MedUNAB* 4.
- 35 Isbister, G., 2003. Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon* 41, 519-524.
- Kaiser, I. I., Griffin, P. R., Aird, S. D., Hudiburg, S., Shabanowitz, J., Francis, B., John, T.R., Hunt, D. F. y Odell, G., 1994. Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon* 32, 1083-1093.
- 40 Livett, B. G., Sandall, D. W., Keays, D., Down, J., Gayler, K. R., Satkunathan, N. y Khalil, Z., 2006. Therapeutic applications of conotoxins that



- target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 41, 839-849.
- Malmberg, B. y Yaksh, T. L., 1994. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J. Neurosci.* 14, 4882-4890.
- 5 Mant, T. C. y Hodges, R. S. (1991). *High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis and conformation*. Boca Raton, FL., CRC Press Inc.
- Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gélot, A., Cupo, A., Zimmer, A., Zimmer, A. M., Eschalier, A. y Lazdunski, M., 2007. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.* 10, 943-945.
- 10 McGivern, J. G., 2007. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neurology. Dis. Treat.* 3, 69-85
- 15 Nason, D., Phillips, D., Saccomano, N. y Volkmann, R. (1994). Calcium channel blocking polypeptides from theraphosidae *Aphonopelma*. WO/1994/10196; PCT/US93/09069.
- Park, S. P., Kim, B. M., Koo, J. Y., Cho, H., Lee, C. H., Kim, M., Na, H. S. y Oh, U., 2008. A tarantula spider toxin, GsMTx4, reduces mechanical and neuropathic pain. *Pain* 137, 208-217.
- 20 Rash, L. D. y Hodgson, W. C., 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40, 225-254.
- Roerig, S. y Howse, K., 1996. Omega-agatoxin IVA blocks spinal morphine/clonidine antinociceptive synergism. *Eur. J. Pharmacol.* 314, 293-300.
- 25 Savel-Niemann, A., 1989. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multi-component system. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370, 485-498.
- Schanbacher, F., Lee, C. K., Hall, J. E., Wilson, I. B., Howell, D. E. y Odell, G. V., 1973. Composition and properties of tarantula *Dugesia hentzi* (Girard) venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 44, 389-396.
- 30 Schmalhofer, W. A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M. G., Weinglass, A. B., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., Koltzenburg, M. y Priest, B. T., 2008. ProTx-II, a Selective Inhibitor of Na V 1.7 Sodium Channels, Blocks Action Potential Propagation in Nociceptors. *Mol. Pharmacol.* 74, 1476-1484.
- 35 Souza, A. H., Ferreira, J., Cordeiro, N., Vieira, L. B., De Castro, C. J., Trevisan, G., Reis, H., Souza, I. A., Richardson, M., Prado, M. A., Prado, V. F. y Gomez, M. V., 2008. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from tarantula spider venom. *Pain* 140.
- 40 Villarejo-Diaz, M., 2001. Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Rev. Hosp. Met.* 1, 65-97.
- Zhang, M. M., Green, B. R., Catlin, P., Fiedler, B., Azam, L., Chadwick, A., Terlau, H., McArthur, J. R., French, R. J., Gulyas, J., Rivier, J. E., Smith, B. J., Norton, R. S., Olivera, B. M., Yoshikami, D. y Bulaj, G., 2007. Structure/function characterization of micro-conotoxin KIIIA, an

21
analgesic, nearly irreversible blocker of mammalian neuronal
nels. J. Biol. Chem. 282, 30699-30706.



22

REIVINDICACIONES



1. Un péptido aislado y purificado con actividad analgésica, caracterizado por:
 - a) Presentar una secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1;
 - 5 b) Presentar un peso molecular teórico de 4,559.6 Daltones, por espectrometría de masas;
 - c) Presentar un punto isoeléctrico calculado de 9.3; y
 - d) Presentar una estructura beta plegada en su estructura secundaria.
- 10 2. Un péptido analgésico de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la actividad analgésica que presenta es contra los dolores agudo y crónico.
- 15 3. Un segmento de ADN que codifica para el péptido analgésico de la reivindicación 1, caracterizado por presentar una secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.
- 20 4. Una composición farmacéutica con actividad analgésica, caracterizada porque comprende el péptido de la reivindicación 1, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, caracterizada porque su actividad analgésica es contra los dolores agudo y crónico.
6. El uso de un péptido analgésico con secuencia aminoacídica SEQ.ID.NO:1 en la fabricación de un medicamento con actividad analgésica.

23



RESUMEN

La presente invención se refiere a un nuevo péptido denominado BvTx47 (SEQ ID NO: 1), con actividad analgésica, probada en ratones macho cepa CD-1. El péptido comprende 40 aminoácidos y tiene un peso molecular de 4,559.6 Daltones. Fue aislado y purificado a partir del veneno de la araña *Brachypelma verdezy*. Dicho péptido también puede ser obtenido por otros medios como síntesis química, o bien mediante la técnica del ADN recombinante, para lo cual la presente invención también provee la secuencia nucleotídica codificante. El péptido BvTx47 (SEQ ID NO: 1) es de estructura secundaria beta plegada y con puentes disulfuro tipo DDH (direct disulfide hairpin por sus siglas en inglés, o también denominado, rizo guiado por disulfuros), la cual difiere de la estructura de otros péptidos, como los que presentan la estructura ICK (inhibitor cysteine knot, por sus siglas en inglés, o también denominado, nudo inhibidor de cisteínas).

17

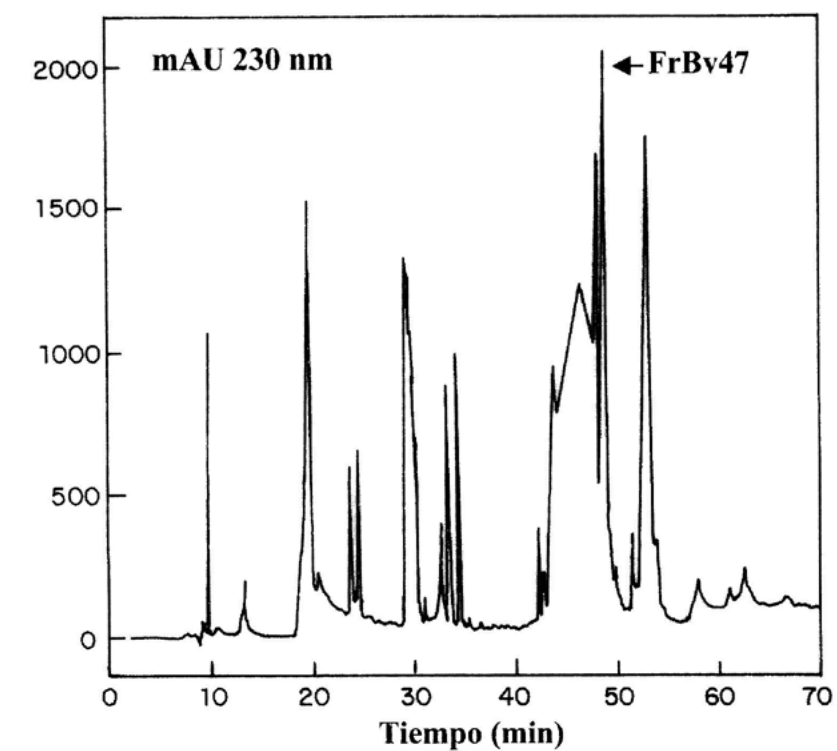


FIGURA 1

2/7



3/7

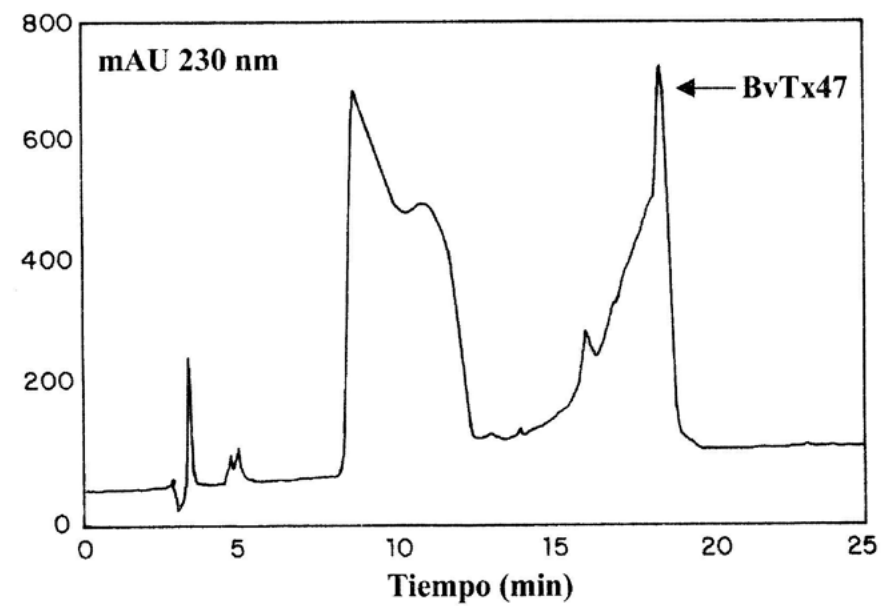


FIGURA 2

Secuencia de aminoácidos de BvTx47

Péptido	Secuencia
BvTx47	TIFECVFSCDIKKEGKPKPKGEKKCTGGWRCKIKMCLKI

FIGURA 3

4/7



Alineamiento de BvTx47 con otros péptidos similares

Péptido	Secuencia	Ide. (%)	Referencia
BvTx47	TIIECVFSCDIKKEGKPKPKGKKTGGWRCKIKMCLKI	100	Esta invención
Ba1a	IIECVFSCDIKKEGKPKPKGKKTGGWRCKIKLCLKI	97	Corzo et al., 2008
Ba1b	FECVFSCKIKKEGKPKPKGKKTGGWRCKIKLCLKI	97	Corzo et al., 2008
Aspla	IFECVFSCKIEKEGKPKPKGKKTGGWKCKIKLCLKI	92	Savel-Niemann, 1989
Asplf	IFECVFSCKIEKEGKPKPKGKKTGGWKCKIKLCLKI	92	Savel-Niemann, 1989
Asplg	IFECVFSCKIEKEGKPKPKGKKTGGWKCKIKLCLKI	89	Savel-Niemann, 1989
Bs1a	IFECVFSCKIEKEGKPKPKGKKTGGWKCKIKLCLKI	89	Kaiser et al., 1994
Bs1b	IIECVFSCDIKKEGKPKPKGKKTGGWKCKIKLCLKI	87	Kaiser et al., 1994
Secuencia 8	LFECVLSCKIKKNGKPKPKGKKTGGWRCKINFCLKV	82	Nason et al., 1994
Secuencia 3	LFECALSCDIKKNKPKPKGKKTGGWRCKINFCLKI	82	Nason et al., 1994

FIGURA 4

5/7

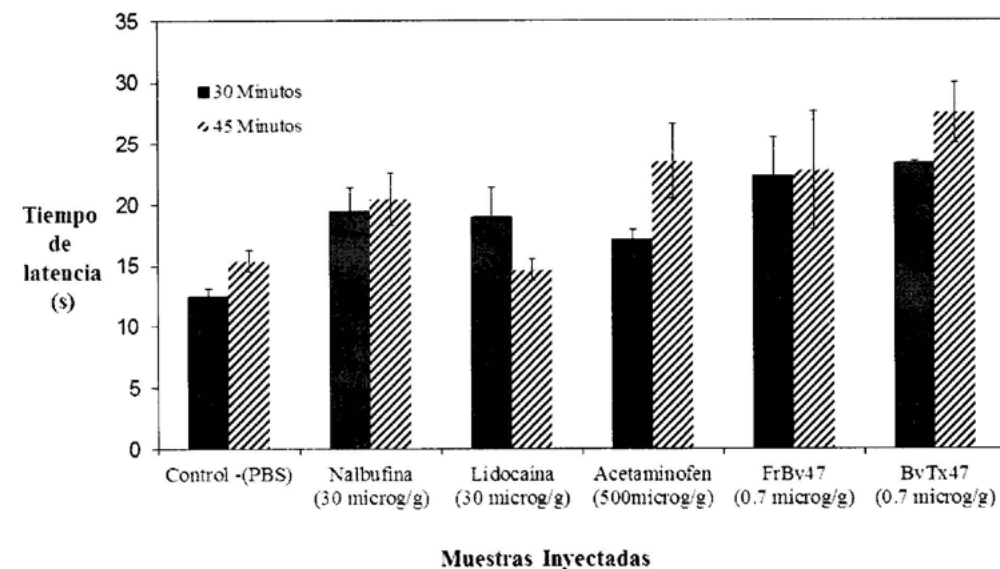


FIGURA 5

6/7

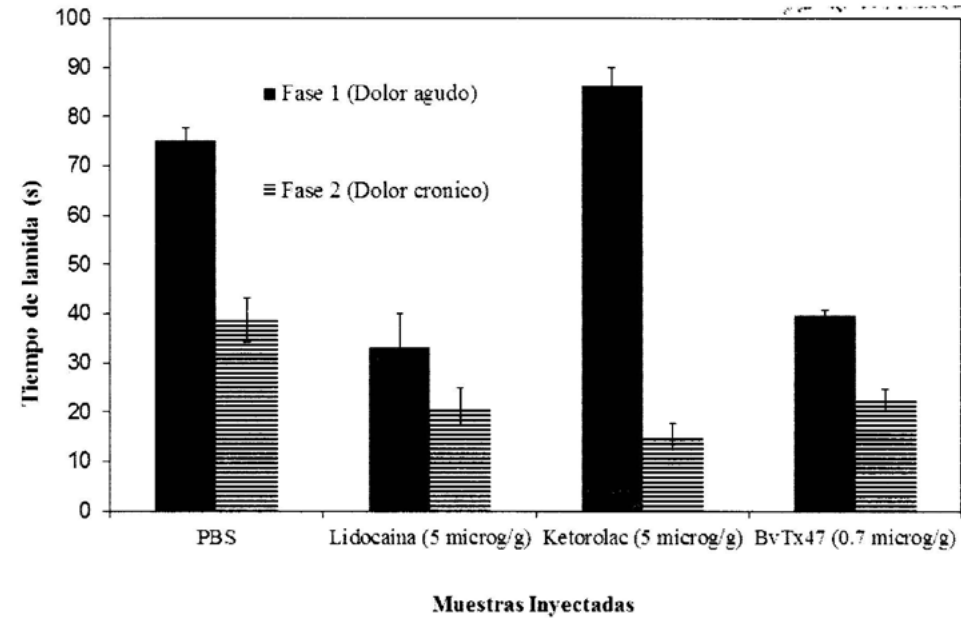


FIGURA 6

7/7

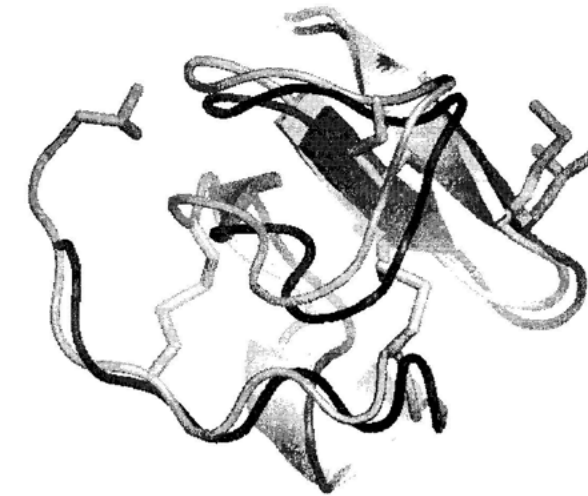


FIGURA 7

1

LISTADO DE SECUENCIAS

No. DE SECUENCIAS: 7

(1) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO: 1

I.- CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: lineal

II.- TIPO DE MOLECULA: péptido

III.- HIPOTETICA: no

IV.- ANTI-SENTIDO: no

V.- TIPO DE FRAGMENTO: fragmento C-terminal

VI.- FUENTE ORIGINAL

- (A) ORGANISMO: *Brachypelma albiceps*
- (D) ESTADO DE DESARROLLO: adulto

VII.- FUENTE INMEDIATA

- (A) VENENO
- (B) CLONAS: ARNm

IX.- CARACTERISTICAS: péptido maduro

NOMBRE/CLAVE: BvTx47

LOCALIZACIÓN: de 1 a 40 aminoácidos

MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: experimentalmente

OTRA ACTIVIDAD: actividad analgésica

Thr Ile Phe Glu Cys Val Phe Ser Cys Asp Ile Lys Lys Glu Gly Lys
1 5 10 15

Pro Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys Cys Thr Gly Gly Trp Arg Cys
20 25 30



2

Lys Ile Lys Met Cys Leu Lys Ile
35 40

(2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO: 2

I.- CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 120 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótidos
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGIA: lineal

II.- TIPO DE MOLECULA: ADNc para ARNm

III.- HIPOTETICA: no

IV.- ANTI-SENTIDO: no

VI.- FUENTE ORIGINAL

- (A) ORGANISMO: *Brachypelma albiceps*
- (D) DESARROLLO: adulto

IX.- CARACTERÍSTICAS

(B) LOCALIZACIÓN: de 1 a 120 pares de bases

(C) METODO DE IDENTIFICACIÓN: teórico

(D) OTRA INFORMACIÓN: codifica para el BvTx47, péptido con actividad analgésica, que tiene un grupo carboxilo en el último aminoácido (Glu-CO₂H).

acn ath tty gar tgy gtn tty tcn tgy gay ath aar aar gar ggn aar 48
Thr Ile Phe Glu Cys Val Phe Ser Cys Asp Ile Lys Lys Glu Gly Lys
1 5 10 15

ccn tgy aar ccn aar ggn gar aar aar tgy acn ggn ggn tgg cgn tgy 96
Pro Cys Lys Pro Lys Gly Glu Lys Lys Cys Thr Gly Gly Trp Arg Cys
20 25 30



3
aar ath aar atg tgy ctn aar ath
Lys Ile Lys Met Cys Leu Lys Ile
35 40



(3) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO: 3

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Artificial

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: ADAP3.

(B) LOCALIZACION: 1 a 45

gcgagcacag aattaatacg actcactata ggtttttttt ttttt 45

(4) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO: 4

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Artificial

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: Outer.

(B) LOCALIZACION: 1 a 23

gcgagcacag aattaatacg act 23

4
(5) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO: 5

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Artificial

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: 47FW.

(B) LOCALIZACION: 1 a 23

attctcgaat ggtttttctc atg 23

(6) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO: 6

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Artificial

(IX) CARACTERISTICAS

(A) NOMBRE: Inner.

(B) LOCALIZACION: 1 a 32

cgcgaaatccg aattaatacg actcactata gg 32

(7) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO: 7

(I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:



5



- (A) LONGITUD: 16 pb
- (B) TIPO: nucleótidos
- (II) TIPO DE MOLECULA: oligonucleótido
- (III) HIPOTÉTICA: No
- (IV) ANTISENTIDO: No
- (VI) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: Artificial
- (IX) CARACTERISTICAS
- (A) NOMBRE: M13 Forward.
- (B) LOCALIZACION: 1 a 16

gtaaaacgac ggccag

16

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 November 2008 (20.11.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/139243 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 14/435 (2006.01) G01N 33/94 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2007/001544

(22) International Filing Date: 14 May 2007 (14.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO [MX/MX]; 9º Piso de la Torre Rectoría, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CEP-04510 México (MX).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): POSSANI POSTAY, Lourival, Domingos [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, CEP-62210 Morelos (MX). GURROLA-BRIONES, Georgina [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, CEP-62210 Morelos (MX). SALAS-CASTILLO, Saida Patricia [MX/MX]; Heriberto Jara No.6, Col. Ruiz Cortines, Tuxpan, CEP-92880

Veracruz (MX). FERREIRA BATISTA, Cesar Vicente [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, CEP-62210 Morelos (MX). VARGA, Zoltán, S. [HU/HU]; Korhaz utca 3.II/8, H-Debrecen 4028 (HU). PANYI, György [HU/HU]; Goher utca 17/a, H-40314 Debrecen (HU). GÁSPÁR, Rezső [HU/HU]; Dézsi A. utca 3, H-Debrecen 4034 (HU).

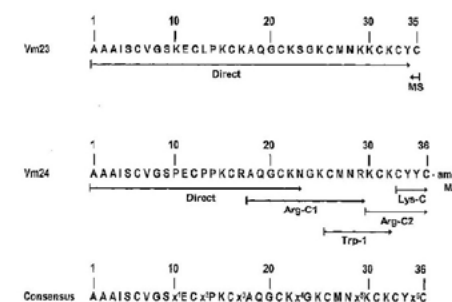
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: VM23 AND VM24, TWO SCORPION PEPTIDES THAT BLOCK HUMAN T-LYMPHOCYTE POTASSIUM CHANNELS (SUB-TYPE KV1.3) WITH HIGH SELECTIVITY AND DECREASE THE IN VIVO DTH-RESPONSES IN RATS

Fig. 2



(57) Abstract: Potassium channels Kv1.3 are known to be implicated in immunological diseases and graft rejections. Disclosed are peptides capable of blocking with high affinity and specificity potassium channels Kv1.3, their pharmaceutical compositions, and methods for their use to block Kv1.3 potassium channels, to treat various immunological conditions and to diagnostic applications. Methods for their chemical synthesis and correct folding are also disclosed. Exemplary peptides correspond to protein components (Vm23 and Vm24) isolated from the venom of the Mexican scorpion Vaejovis mexicanus smithi. Vm23 and Vm24 bind to hKv1.3 channels in an almost irreversible manner, showing a Kd value in the order of 3 picomolar range, when applied to human lymphocytes cultures in vitro. Vm24 was chemically synthesized and used in in vivo experiments to successfully treat sensitized rats (on the DTH-response). Neither Vm24 nor synthetic Vm24 is toxic to mice when injected at relatively high concentrations (assayed up to 10,000 micrograms per kilogram mouse body weight). These peptides (Vm24 and Vm23) and their functional equivalent analogs with at least 83% of sequence identity are lead compounds, candidates for the treatment of various immunological conditions and diagnostic applications.

WO 2008/139243 A1

EP 2 158 213 B1



(11) EP 2 158 213 B1

(12) EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(45) Date of publication and mention of the grant of the patent:
14.12.2011 Bulletin 2011/50

(51) Int Cl.:
C07K 14/435^(2006.01) A61K 38/04^(2006.01)
G01N 33/68^(2006.01) G01N 33/94^(2006.01)
A61P 37/06^(2006.01)

(21) Application number: 07734817.5

(86) International application number:
PCT/IB2007/001544

(22) Date of filing: 14.05.2007

(87) International publication number:
WO 2008/139243 (20.11.2008 Gazette 2008/47)

(54) VM23 AND VM24, TWO SCORPION PEPTIDES THAT BLOCK HUMAN T-LYMPHOCYTE POTASSIUM CHANNELS (SUB-TYPE KV1.3) WITH HIGH SELECTIVITY

VM23 UND VM24, ZWEI SKORPIONPEPTIDE, DIE HUMANE T-LYMPHOZYTEN-KALIUMKANÄLE (UNTERTYP KV1.3) MIT HOHER SELEKTIVITÄT BLOCKIEREN

VM23 ET VM24, DEUX PEPTIDES DE SCORPION QUI BLOQUENT LES CANAUX POTASSIQUES DES LYMPHOCYTES T HUMAINS (SOUS-TYPE KV1.3) AVEC UNE SÉLECTIVITÉ ÉLEVÉE

(84) Designated Contracting States:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE
SI SK TR

(74) Representative: Daniels, Jeffrey Nicholas
Page White & Farrer
Bedford House
John Street
London WC1N 2BF (GB)

(43) Date of publication of application:
03.03.2010 Bulletin 2010/09

(56) References cited:
EP-A- 0 916 681 WO-A-2006/116156

(73) Proprietor: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
C.P. 04510 Mexico
D.F. Mexico (MX)

- BATISTA CESAR V F ET AL: "Two novel toxins from the Amazonian scorpion Tityus cambridgei that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1601, no. 2, 16 December 2002 (2002-12-16), pages 123-131, XP002464263 ISSN: 0006-3002
- OLAMENDI-PORTUGAL ET AL: "Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion Centruroides elegans selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells" TOXICON, ELMSFORD, NY, US, vol. 46, no. 4, 15 September 2005 (2005-09-15), pages 418-429, XP005045659 ISSN: 0041-0101
- DE LA VEGA RICARDO C RODRIGUEZ ET AL: "Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels" TOXICON, vol. 43, no. 8, 15 June 2004 (2004-06-15), pages 865-875, XP002464264 ISSN: 0041-0101 cited in the application

(72) Inventors:

- POSSANI POSTAY, Lourival, Domingos CEP-62210 Morelos (MX)
- GURROLA-BRIONES, Georgina CEP-62210 Morelos (MX)
- SALAS-CASTILLO, Saida Patricia CEP-92880 Veracruz (MX)
- FERREIRA BATISTA, Cesar Vicente CEP-62210 Morelos (MX)
- VARGA, Zoltán, S. H-Debrecen 4028 (HU)
- PANYI, György H-40314 Debrecen (HU)
- GÁSPÁR, Rezső H-Debrecen 4034 (HU)

- GIANGIACOMO KATHLEEN M ET AL: "Molecular basis of alpha-KTx specificity" TOXICON, vol. 43, no. 8, 15 June 2004 (2004-06-15), pages 877-886, XP002464265 ISSN: 0041-0101 cited in the application
- TYTGAT J ET AL: "A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARTH, GB, vol. 20, no. 11, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 444-447, XP004182937 ISSN: 0165-6147 cited in the application
- PANYI G ET AL: "K⁺ channel blockers: Novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol. 12, no. 18, 2006, pages 2199-2220, XP002464266 ISSN: 1381-6128 cited in the application

- PANYI GYRGY ET AL: "Ion channels and lymphocyte activation" IMMUNOLOGY LETTERS, vol. 92, no. 1-2, 29 March 2004 (2004-03-29), pages 55-66, XP002464267 & 12TH SYMPOSIUM ON SIGNALS AND SIGNAL PROCESSING IN THE IMMUNE SYSTEM - ANEFIS (EUROPEAN FEDERATION; SOPRON, HUNGARY; SEPTEMBER 03-07, 2003 ISSN: 0165-2478 cited in the application
- VARGA Z ET AL: "Involvement of membrane channels in autoimmune disorders" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN 2007 NETHERLANDS, vol. 13, no. 24, 2007, pages 2456-2468, XP002464268 ISSN: 1381-6128

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

EP 2 158 213 B1

Description

FIELD OF THE INVENTION

5 [0001] The present invention relates generally to the fields of biochemistry, molecular biology, immunology and electrophysiology. Disclosed are peptides, their pharmaceutical compositions, and methods for their use to block Kv1.3 potassium channels, their use for the treatment of various immunological conditions and for diagnostic applications, and methods for the chemical synthesis and correct folding procedures for peptides corresponding to two protein components isolated from the venom of the Mexican scorpion *Vaejovis mexicanus smithi* (here abbreviated thereafter: *V. mexicanus*), which constitute a new sub-family of potassium channel specific ligands, capable of blocking with high affinity and specificity a sub-type of potassium channels (hKv1.3) shown to be implicated in immunological diseases and graft rejections. Methods and techniques used for their chemical and functional characterization are disclosed, as well as the results of *in vivo* experiments on the DTH-response of sensitized rats when treated with Vm24. This peptide (Vm24), its homologous Vm23 and their functional equivalent analogs are lead compounds, candidates for the treatment of various immunological conditions and diagnostic applications.

BACKGROUND OF THE INVENTION

General considerations

20 [0002] Several aspects should be taken into consideration concerning the subject of the invention reported here, among which are the important advances in the fields of biochemistry, molecular biology, immunology and electrophysiology related to the knowledge generated about:

- 25 1)- the presence of integral proteins of biological membranes termed "ion-channels" playing a fundamental role in cellular communication, signal transduction pathways and general homeostasis of tissues and various organ functions;
- 30 2)- different levels of expression of these channels in cells of the immune system, mainly in T-lymphocytes, shown to play a clear role in events related to the onset of autoimmune diseases;
- 35 3)- the possible control of the channel function, hence possible treatment of disorders, through the addition of various chemicals, natural ligands and synthetically prepared substances, either reproducing the ligand as found in nature or preparing similar derivatives (peptidomimetics).

[0003] A multitude of potassium (K) channels have been discovered and reported to exist in the last fifteen years permitting their isolation, individual expression and functional analysis.

[0004] They are multimeric proteins implicated in the determination of cell membrane potential, thereby controlling smooth muscle tone, synaptic excitability, neurotransmitter release, and other processes. In this invention we want to emphasize the importance of a K channel species, sub-type Kv1.3, and its role in lymphocyte proliferation and in the control of autoimmune diseases by means of inhibiting this channel. This is a delayed-rectifier channel predominantly expressed in T lymphocytes [Grissmer et al., 1990; Lewis and Cahalan, 1995], different from the sub-types Kv1.1, Kv1.2 widely distributed in brain or Kv1.5 in heart tissue, to mention just a few of the sub-types of K channels.

[0005] The mechanisms by which modulation of Kv1.3 channels activity affects lymphocyte proliferation are being investigated in several laboratories and were the object of many recent publications (reviewed in [Beeton and Chandy, 2005; Judge and Bever, 2006; Panyi et al., 2006], including some patents (v.gr. US 5,397,702 by Cahalan et al. 1995 and US 6,077,680 by Kem et al. 2000).

[0006] Autoimmune diseases are known for their considerable worldwide morbidity. Among these diseases are: type-1 diabetes mellitus (insulin dependent), multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus (SLE), myasthenia gravis, to mention just some of them. A relevant experimental model for autoimmune diseases is the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). It is generally accepted that these autoimmune diseases result from the response of the immune system destroying specific tissues, either by a direct attack to the cells, or by producing auto-antibodies. The over-expression of Kv1.3 channels is a characteristic feature of autoreactive T cells thereby providing an excellent opportunity for the modification of their proliferation by blockers of Kv 1.3.

[0007] In these lines of research and experimentation, several substances were described and even patented. One such example is the toxin ShK from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* and several derivatives of it, claimed to have a protective effect against several autoimmune diseases (v.gr. US 6,077,680 by Kem et al. 2000).

EP 2 158 213 B1

5 [0008] Among other natural ligands that are capable of affecting the function of ion-channels are toxic peptides isolated from scorpion venoms. K channel specific peptides isolated from these venoms are short-chain peptides containing 22 to 42 amino acids compacted by either three or four disulfide bridges. They are blockers of many different sub-types of channels, with a huge variability in selectivity and affinity (reviewed in [Giangiacoimo et al., 2004; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004]). For example, charybdotoxin is a potent blocker of Kv1.1, Kv1.2 and 1.3 *Shaker* type delayed rectifier channels but also blocks maxi-type K(Ca) channels [Rauer et al., 2000]. Margatoxin, another scorpion venom peptide, lacks K(Ca) channel blocking activity, but maintains a high affinity block of Kv1.3 channels. [Garcia-Calvo et al., 1993]. Agitoxin, noxiustoxin, kaliotoxin are examples of scorpion toxins that affect different types of K channels with distinct affinities and selectivities, but usually modify more than one sub-types of channels (recent reviewed in [Panyi et al., 2006]). Due to their relatively rigid three-dimensional structure, tightly maintained by disulfide bridges, some of these scorpion peptides have been used as "molecular calipers" for measuring distances between K channel amino acid residues in the outer vestibule of the channels [Krezel et al., 1995; Garcia et al., 2000]. The three dimensional structure of many scorpion toxins specific for K channels was resolved by nuclear magnetic resonance and/or X-ray diffraction methods, and in conjunction with the known structure of some K channels have provided the clue to model the interaction between the receptor (ion-channel) and the ligand (scorpion toxin). Site-directed mutagenesis of amino acid residues in both the ion-channels and the ligands has provided information for the identification of the putative interaction surface among this pair of receptor-ligand proteins [Rodriguez de la Vega et al., 2003]. This information is fundamental for the rational design of possible drugs with potential pharmacological applications. The only problem in using these naturally occurring peptides as potential drugs is the lack of specificity and affinity. At present, there are 20 sub-families of scorpion toxins, comprising over 125 structurally related peptides, classified by their sequence similarities and possible functions [Tytgat et al., 1999; Rodriguez de la Vega and Possani, 2004].

[0009] The following examples may also be mentioned:

BATISTA CESAR V F ET AL: (BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Vol. 1601, No. 2, pages 123 to 131) discloses two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block KV1.3 and Shaker B k+-channels; WO 2006/116156 A discloses toxin peptide therapeutic agents; EP 0916681 A relates to neuron peptides originating in scorpion; and OLAMENDI-PORTUGAL ET AL (2005) (TOXICON, ELMSFORD, NY, US, vol. 46, no. 4, pages 418 to 419) concerns novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion.

Molecular basis for Kv1.3 inhibitor-based therapy of autoimmune diseases

[0010] In this section the inventors present the state of the art knowledge on the control of several immunological diseases by simple application of ligands (peptides or organic compounds) capable of blocking with high affinity and high specificity the Kv1.3 ion-channels of "effector memory T-cells" (T_{EM}) of lymphocytes.

[0011] It has been shown earlier that the mechanism by which Kv1.3 inhibitors interfere with the activation processes of lymphocytes evoked by physiological antigen stimulation or mitogens is the depolarization of the membrane and the consequent inhibition of the Ca^{2+} signal required for normal progression of the cell cycle to proliferation and production of the T-cell clones specific for a challenging antigen (reviewed in [Cahalan et al., 2001; Panyi et al., 2004; Panyi et al., 2006]). There are two types of K channels being responsible for maintaining a sufficiently hyperpolarized membrane potential (-50, -60 mV) [Verheugen et al., 1995] of T cells, the voltage-gated and depolarization activated channel denoted as Kv1.3 [Decoursey et al., 1984; Matteson and Deutsh, 1984]; and the Ca^{2+} -activated K channel of intermediate conductance denoted as IKCa1 (or $K_{Ca}3.1$ according to a recent nomenclature) [Grissmer et al., 1993]. The activity of these channels provides the counterbalancing positive charge efflux required for the maintenance of a negative membrane potential during the influx of Ca^{2+} into the T cells through the Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels [Feske et al., 2006; Yeromin et al., 2006]. The contribution of these two types of K channels to the membrane potential of T cells depends on the activation status of the cells (resting vs. activated) and their functional role in the immune system determined by the degree of terminal differentiation of the T cells, as discussed below [Wulff et al., 2003].

[0012] Two types of T cells, the naive and central memory T cells (T_{CM}), require strong antigen stimulation and co-stimulation in peripheral (secondary) lymphoid organs to be activated. The naive T cells that have not encountered previously an antigen bear CCR7⁺CD45RA⁺ functional marker expression. Central memory T cells (T_{CM} , CCR7⁺CD45RA⁻), which cells mediate *reactive memory*, are probably arrested at intermediate stages of terminal differentiation to become effector memory cells (T_{EM}) [Sallusto et al., 2004]. These cells have little or no effector function, but readily proliferate and differentiate to effector cells in response to antigenic stimulation. *Protective memory* is governed by effector memory T_{EM} cells (CCR7⁻CD45RA⁺). T_{EM} cells display characteristic sets of chemokine receptors and adhesion molecules that are required for homing to inflamed tissues where they exert immediate effector function. In several autoimmune diseases, including multiple sclerosis (MS) (Wulff et al., 2003), rheumatoid arthritis and type-1 diabetes mellitus [Beeton et al., 2006], autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia and bone resorption periodontal disease, chronically activated T_{EM} cells are responsible for tissue damage, thus

EP 2 158 213 B1

selective inhibition of the proliferation and functional activity of these cells is of utmost importance in the management of these diseases (reviewed in [Chandy et al., 2004; Beeton and Chandy, 2005; Panyi et al., 2006].

[0013] Resting human naïve, T_{CM} and T_{EM} of either CD4⁺ (helper) or CD8⁺ (cytotoxic) phenotype express similar number (200-300) of Kv1.3 and fewer than 30 IKCa1 channels per cell [Wulff et al., 2003]. Transformation of naïve and T_{CM} cells to proliferating blast cells by specific antigen stimulation is accompanied by a modest (~1.5-fold) increase in the number of Kv1.3 channels per cell, whereas the number of IKCa1 channels increase dramatically (500 channel/cell) and thus, they acquire an IKCa1^{high}Kv1.3^{low} ion channel phenotype. In contrast, activation of T_{EM} of either CD4⁺ or CD8⁺ phenotype in the peripheral tissues is accompanied by a dramatic increase in the number of Kv1.3 channels to ~1500/cell without any change in the IKCa1 level thereby the channel phenotype of activated T_{EM} becomes IKCa1^{low}Kv1.3^{high}.

[0014] The causal link between Kv1.3^{high}T_{EM} and autoimmune disorders is substantiated by the following data obtained in human diseases:

- 1) myelin-reactive T cells from the peripheral blood of MS patients are Kv1.3^{high} [Wulff et al., 2003];
- 2) myelin-reactive T cells from the peripheral blood of healthy controls are Kv1.3^{low}, consistent with a naïve/T_{CM} phenotype;
- 3) stimulation of MS patient T cells with irrelevant antigens such as insulin peptide, ovalbumin or with conventional mitogens did not induce the generation of T_{EM} with Kv1.3^{high}IKCa1^{low} channel phenotype;
- 4) Kv1.3^{high} T_{EM} cells were shown in postmortem MS brain inflammatory infiltrates and in the parenchyma of demyelinated MS lesions [Rus et al., 2005];
- 5) T cells isolated from the synovial fluid of human patients suffering from Rheumatoid Arthritis (RA) express large amounts of Kv1.3 as compared to T cells of the same donor but isolated from peripheral blood. These Kv1.3^{high} T cells were CCR7⁻ indicating that they are T_{EM} cells [Beeton et al., 2006];
- 6) Short term antigen specific CD4⁺ T cell lines (TCLs) generated from peripheral blood lymphocytes of Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) human patients and specific for T1DM-associated autoantigens insulin and GAD65 display the characteristic features of T_{EM} cells including the lack of CCR7 antigen (CCR7⁻) and Kv1.3^{high} channel phenotype [Beeton et al., 2006].

[0015] As the membrane potential control of T_{EM} cells is exclusively governed by the activity of Kv1.3 channels, the proliferation of these cells, their functional activity, and thus the symptoms of the autoimmune disease, should be ameliorated by the use of Kv1.3 inhibitors. The following *in vitro* and *in vivo* data in the literature support this scenario:

- 1) *In vitro* proliferation of chronically activated human T cell lines bearing the characteristics of T_{EM} (CCR7⁻, Kv1.3^{high}) and specific for myelin antigen [Wulff et al., 2003] or T_{EM} cells isolated from the synovial fluid of RA patients is completely and permanently suppressed by Kv1.3 specific blockers peptide such as ShK [Wulff et al., 2003], ShK (L5) or by the small-molecule Kv1.3 blocker PAP-1 [Beeton et al., 2006];
- 2) *In vivo* experiments with Margatoxin, another high affinity Kv1.3 blocker peptide, showed that block of Kv1.3 leads to the inhibition of delayed-type hypersensitivity reactions in miniswine; this reaction is a good measure of the activity of effector memory T cells [Koo et al., 1997];
- 3) Treatment of MBP-specific rat T cells with ShK or ShK-Dap²² during their *in vitro* stimulation with MBP (sensitization phase) along with repeated application of the peptides into the recipient animals (during the effector phase) prevented the adoptive transfer of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (AT-EAE) into Lewis rats [Beeton et al., 2001]. EAE in rats [Ben Nun and Cohen, 1982], is the best characterized model for the human disease MS characterized by similar pathogenesis and neurological abnormalities, and the disease causing T cell population is the myelin-specific T_{EM} having Kv1.3^{high} channel phenotype. The combined application of Kv1.3 and IKCa1 channel blockers also ameliorated the symptoms of EAE when administered following its onset [Beeton et al., 2001];
- 4) Pristane-induced MHC class II-restricted chronic arthritis model (PIA) in Dark Agouti rats is a rat model for the human disease Rheumatoid Arthritis. Single daily injections of ShK(L5) significantly reduced the number of joints affected by the disease during the trial period (up to 34 days) [Beeton et al., 2006];

EP 2 158 213 B1

5) The efficacy of a Kv1.3 inhibitor to prevent experimental autoimmune diabetes (EAD, a rat model for T1DM of humans) was studied in MHC class II-restricted DP-BB/W rats [Beeton et al., 2006]. It was shown that repeated daily administration of PAP-1, a high affinity and selectivity small-molecule blocker of Kv1.3 reduced the fraction of rats showing the symptoms of EAD by ~50% (assayed at 110 days of age) as compared to control animals treated with vehicle only. This was accompanied by a decreased intraislet T cell and macrophage infiltration and reduced β cell destruction in the PAP-1-treated group as compared with vehicle-treated control (assayed between 35-70 days of age) [Beeton et al., 2006].

[0016] The inhibition of T cell proliferation by Kv1.3-specific inhibitors is specific to T_{EM} cells, which makes these compounds ideal tools for the management or prevention of autoimmune diseases. Although antigen-induced proliferation of resting naïve and T_{CM} cells is partially sensitive to Kv1.3-mediated inhibition, the transcriptional up-regulation of IKCa1 channels overcomes this in pre-activated T cells and renders the proliferation of these cells to be sensitive to IKCa1 inhibitors but not to Kv1.3 inhibitors [Ghanshani et al., 2000]. This restricted action of Kv1.3 and IKCa1 inhibitors on different T cell subsets underlies the importance of the selectivity of a given molecule for Kv1.3 over IKCa1. It was also shown recently that the inhibition of T_{EM} proliferation by Kv1.3 inhibitors can be overcome by excessive antigen stimulation mimicking the activation of T_{EM} cells by pathogens and vaccine antigens during normal protective memory immune reactions [Beeton et al., 2006]. Thus, the application of high affinity and high selectivity Kv1.3 inhibitors ideally targets T_{EM} cells repeatedly activated during autoimmune reactions whereas leave other protective functions of the immune system unaltered.

[0017] In addition to human T and B lymphocytes Kv1.3 channels are also expressed in several organs and tissues (including the central nervous system, kidney, liver, skeletal muscle), and the block of Kv1.3 channels in the cells may give rise considerable side effects. Extensive *in vitro* and acute and chronic *in vivo* toxicological tests were performed previously for ShK(L5) [Beeton et al., 2005; Beeton et al., 2006] from the peptide blockers group and for PAP-1 [Schmitz et al., 2005; Beeton et al., 2006] from the group of small molecule blockers. These studies showed the lack of clinical symptoms for neurological and cardiac side effects or histopathological changes in tissues where Kv1.3 is expressed. Thus, the beneficial treatment-effects of Kv1.3 blockers listed above combined with minimal or the complete absence of side effects point towards the applicability of selective Kv1.3 blockers in the management of autoimmune diseases.

[0018] In summary, data above suggest a critical role of Kv1.3 K channels in the execution of a physiological immune response, and point to the applicability of a therapeutic intervention in autoimmune disease by the inhibition of Kv1.3 channels.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0019] The present invention concerns the identification and use of novel peptides isolated from the venom of the Mexican scorpion *V. mexicanus*: Vm23, Vm24 and their functional equivalent analogs, which are capable of inhibiting the function of hKv1.3 channels from human lymphocytes with high affinity and specificity, by blocking a specific ion conductance. In other embodiments of the present invention, the inventors disclose pharmaceutical compositions comprising Vm23, Vm24 and their functional equivalent analogs, methods for their use to block Kv1.3 potassium channels, to treat various immunological conditions and to diagnostic applications and methods for their chemical synthesis and correct folding. These peptides were isolated by means of conventional high performance liquid chromatography and have had their primary amino acid sequence determined by Edman degradation and mass spectrometry, showing the primary structure shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. Vm24 contains 36 amino acids with a molecular weight of 3863.5 Daltons. It is a compact molecule maintained by four disulfide bridges established by mass spectrometry to be between pairs of cysteines at positions C6 and C26, C12 and C31, C16 and C33, and C21 and C36, where the letter C stands for the abbreviation of cysteine residues and the numbers correspond to their relative positions into the amino acid sequence. The amino acid at the carboxylic end of the peptide is amidated. The full peptide was chemically synthesized using the solid phase method of Merrifield and the correct folding of the synthetic peptide was obtained and confirmed by both chemical and functional analysis. Vm24 is not toxic to mice when injected at relatively high concentration (assayed up to 200 micrograms per mouse of 20 grams body weight, that is: 10,000 microgram/kilogram mouse weight). When applied to human lymphocytes *in vitro*, it shows an extremely high affinity for hK.v1.3 channels assayed by the patch-clamp technique. It binds to these channels in an almost irreversible manner, showing a K_d value in the lower picomolar range (less than 3 picomolar - 3 pM). It does not modify the potassium currents of the following ion channels: hKv1.4, Kv1.5, Kv2.1, hKv1.1, hKv1.2, hERG-channel, and the currents of the voltage-gated cardiac Na⁺ channel (hNav1.5) when assayed at a concentration of 10 nanomolar (10 nM). The current inhibition at 10 nM concentration for channels hKCa1, mKv1.1 and hKv1.2 is approximately 20 to 50%, as opposed to 100% blockage for hKv1.3 channels. The toxin blocks over 50% of the hKv1.3 current at a concentration as low as 3 pM, thus being approximately 1500-fold more effective on this channel than any of the other channels assayed.

[0020] Lethality tests conducted with Vm24 caused no observable symptoms of intoxication using concentrations up

EP 2 158 213 B1

to 200 microgram/20 gram mouse weight. Vm24 applied to the rat model for delayed-type hypersensitivity (DTH) protected the experimental animals. Skin sensitization of experimental rats with dinitrofluorobenzene (DNFB) causes a considerable immunological response (redness and gross inflammation of ears). Groups of rats subjected to a single injection of 10 micrograms of Vm24 on day six after starting the treatment show a considerable attenuation of the immune response; the inflammation of the treated ears is significantly decreased (at least 60% less inflammation) compared to control rats that received only solvent treatment.

[0021] A related peptide named Vm23, was also isolated from the same venom and completely sequenced, as shown in SEQ ID NO:2. This peptide is 83% identical to Vm24, has 35 amino acid residues, packed by four disulfide bridges, and shows a molecular weight of 3665 Daltons. Vm23 displays equivalent function as Vm24: high affinity and specificity for hKv1.3 channels. The blockage of the currents for channels hKv1.3, hKCa1, mKv1.1 and hKv1.2 at 10 nM concentration of Vm23 were approximately 95%, 1%, 3% and 9%, respectively.

[0022] Phylogenetic analysis conducted with both peptides using more than 125 other known scorpion peptides [Bagdany et al., 2005], specific for K channels, showed that Vm23 and Vm24 do not fall within any of the 20 sub-families of already described scorpion toxin structures. They are the first two examples of a new structural sub-family, here proposed to be named: α -KTx 21. Vm24 and Vm23 thus should be named α -KTx 21.1 and α -KTx 21.2, respectively. Among the criteria used to define new sub-families of scorpion toxins specific for K channels, according to an international panel of scientists that set the systematic nomenclature now in use (see [Tytgat et al., 1999]), are the need for the primary structure to be different by at least 50% of the others. In fact, both Vm23 and Vm24 show less than about 50% sequence similarity with the other known toxins.

[0023] Based on the state of art knowledge of the field, these properties make Vm23, Vm24 and their functional equivalent analogs, excellent candidates for immune suppression and the diagnosis and treatment of immunological diseases.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0024] The drawings included in this disclosure form part of the present specification and are included here to further demonstrate certain aspects of the present invention. The full invention may be better understood by complementing one or more of these drawings with the detailed description of specific embodiments presented herein, especially in the section of the examples below.

Fig. 1: HPLC separation of 1 mg of the soluble venom from the scorpion *V. mexicanus*. More than 80 different components were separately obtained by application of the soluble venom into a C 18 reverse phase column (catalog number 218TP54 from Vydac, Hisperia, CA) equilibrated with solution A (water in 0.10% TFA), using a gradient from 0% to 60% solution B (acetonitrile in 0.12% TFA) over 60 min. Numbers 1 and 2 at retention times 23 and 24 min indicates the elution position of Vm23 and Vm24, respectively. An additional separation of each one of these two chromatographic fractions was conducted in the same system, but using a linear gradient from solution A to 40% solution B, during 60 min for both peptides. The results are shown as inset of the figure. The asterisks in the insets indicate position of elution of highly purified peptides.

Fig. 2: Amino acid sequence of Vm23, Vm24 and consensus. The sequences of Vm23 and Vm24 were obtained by direct Edman degradation of native peptides and reduced and alkylated samples, in combination with mass spectrometry analysis of peptides obtained by enzymatic cleavage of pure peptide with specific enzymes (endoprotease Arg-C and Lys-C), as indicated below the corresponding sequences. The amino acid sequences of the peptides purified after enzymatic hydrolysis and HPLC separation were identified by mass spectrometry analysis (MS/MS, means mass spectrometry fragmentation by electro-spray ionization). Under each sequence are the indications of the segments identified by the various methods used. Direct means Edman degradation, Arg-C and Lys-C are the fragments purified after enzymatic digestion. MS alone means identification based on molecular mass of the missing amino acid. The consensus sequence has 30 amino acid residues which are identical to those of Vm23 or Vm24. The positions labeled as "x" could be: x¹, any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even better K or P; x², any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even better L or P; x³, any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even better K or R; x⁴, any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even better S or N; x⁵, any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even better K or R, and; x⁶, any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even better Y or none at all.

Fig. 3: Vm24 possesses an amidated C terminal. Collisional-Induced Dissociation (CID) of the C-terminal. [M+H]⁺, ion at m/z 909.4 a.m.u. (monoisotopic molecular weight) shows 1.0 unit less than the expected theoretical value of [M+H]⁺ 910.5 a.m.u. The y ion series (*italic*) corresponding to an amidated C-terminal sequence is shown in the insert labeled 1). Theoretical y ion series values for free-carboxy-terminal peptide (TV-COOH), theoretical y ion

EP 2 158 213 B1

series values for amidated C-terminal (TV-NH₂) and experimental y ion series values (EXP.) are compared in the table inserted (insert labeled 2).

Fig. 4: Vm24 heterodimers for disulfide assignment. The numbers 1 and 2 show the molecular weights and schematic structures of the heterodimers produced by simultaneous proteolytic cleavage of Vm24 using trypsin and chymotrypsin at pH 6.5. The [M+H]⁺ ion at m/z 788.0 a.m.u. corresponds to the molecular mass of the heterodimer containing the cystine half-pair C4-C8 (number 1) and the [M+H]⁺ ion at m/z 560.4 a.m.u. to the cystine half-pair C3-C7 (number 2).

Fig. 5: Vm24 cystine half-pairs. A) Mass spectrum corresponding to the structure of the complex core containing both cystine half-pairs, C1-C4 and C2-C6 with [M+2H]²⁺ ion at m/z 1099.7 a.m.u. This was fragmented to produce the MS/MS spectrum shown in figure 5B. The b ion series values from 1137 to 1507 a.m.u. unequivocally represent the tag GSPE confirming the assignment of the last two cystine half pairs. B). Shows the full disulfide bridges arrangement of Vm24, as determined by mass spectrometry analysis described in part A of this figure.

Fig. 6: HPLC purification of synthetic Vm24. Synthetically prepared Vm24 (50 milligram protein) was separated in a C 18 reverse phase preparative column. Number 1 indicates the elution position of synthetic and correctly folded Vm24, whereas 2 and 3 indicate incorrectly folded or truncated sequences. An additional separation of this chromatographic fraction was conducted in the same system, but using an analytical column developed with a linear gradient from solution A to 40% solution B, during 60 min. The results are shown as inset of the figure.

Fig. 7: HPLC comparison of synthetic and natural Vm24 peptide. A) Application of 10 micrograms of native Vm24 into an analytical C18 column (catalog number 218TP54 from Vydac, Hisperia, CA) in the system of HPLC described in Fig.1 shows that the pure peptide elutes at 32.67 min, when developed with a linear gradient from solution A to 40% solution B, during 60 min. B) Chromatogram of 15 micrograms of synthetically prepared and folded Vm24 in the same system and conditions. C) Co-injection of a 1:1 mixture of synthetic and natural Vm24 (total 8 micrograms) showing that they co-elute at the same retention time. It is worth mentioning that the X-axis of the graph is shifted to the right for letters B and C, in order that the three graphs could be observed comparatively, but separately, otherwise the elution times of the three independent HPLC runs would fall into the same peak, and become undistinguishable.

Fig. 8: Sequence and phylogenetic analyses of Vm23 and Vm24. A) Multiple sequence alignment of Vm24 and Vm23 with their most closely related α -KTxs. The alignment was performed with CLUSTAL_X [Thompson et al., 1997] software and the sequence identity with Vm24 (%I, last column) calculated with BioEdit. B) Simplified phylogenetic tree calculated with MrBayes 3.0b4 [Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003]. Vm23 and Vm24 are clustered together and differ substantially from the members of sub-family α -KTx 6.

Fig. 9: Selective block of lymphocyte ion channels by Vm24. A) Whole-cell potassium currents through hKv1.3 channels were evoked from a human T cell in response to depolarizing pulses to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15s. Currents in the absence of Vm24 (control, indicated by arrow) are almost completely blocked when 1 nM Vm24 is administered to the cell via the perfusion of the extracellular medium. Arrow indicates the 1st pulse in Vm24. B) The normalized peak currents as a function of time are shown following the application of 1 nM (filled circles) or 0.3 nM (empty circles) of Vm24. Arrow indicates the start of the application of the toxin. C) The normalized peak currents of a lymphocyte as a function of time are shown as 3 pM Vm24 is applied to the cell and then removed (wash-out) from the extracellular medium. Perfusion with a toxin-free medium resulted in a very slow partial recovery from block with a time constant of ~3800 s. Pulses were delivered every 30s. D) The dose-response relationship for Vm24 was obtained by plotting the remaining current fraction (RCF= I/I_0) as a function of toxin concentration, where I and I_0 are the peak currents measured in the presence and absence of the toxin, respectively, and fitting the data points with the function: $RCF = K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$, where [Tx] indicates the toxin concentration and K_d is the dissociation constant. Error bars indicate SEM (n = 3-6). The dose-response function constructed this way yields a $K_d = 2.9$ pM and a Hill coefficient n~1. E) Ca²⁺ activated K channels of T lymphocytes (hKCa1) were expressed in Cos-7 cells and currents were elicited by voltage ramps from -120 to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 10s. Current traces recorded before the application of the toxin (control), following the equilibration of block in the presence of 10 nM Vm24 for 4.5 min. and following wash-out (wash) of the toxin for 2.5 min. are shown. F) Remaining fraction of the hKCa1 current in the presence of 1 nM and 10 nM Vm24 was calculated s/s_0 where s and s_0 are the slopes of the I-V relationships evoked by voltage ramps in the presence and absence of Vm24, respectively. Error bars indicate SEM (n = 3).

Fig. 10: Vm24 is selective for hKv1.3 among Shaker family (Kv1.x) channels. Current traces recorded before the application of the toxin (control), following the equilibration of block by 10 nM Vm24 and following wash-out (wash) of the toxin are shown. A) mKv1.1 channels were expressed by L929 cells and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 30 s. Equilibrium block developed in 6 min., the duration of the wash-out period was 5 min. B) hKv1.2 channels were expressed by Cos-7 cells and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 30 s. Equilibrium block developed in 5.5 min., the duration of the wash-out period was 7 min. C) hKv1.3 channels were expressed endogenously by

EP 2 158 213 B1

peripheral blood lymphocytes and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s. Equilibrium block developed in 3.5 min., the duration of the wash-out period was 4.5 min. D) Fast inactivation-removed hKv1.4 (Kv1.4ΔN) channels were expressed by Cos-7 cells and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 30 s. The durations of Vm24 application and the wash-out period were 5 min. and 4.5 min., respectively. E) Kv1.5 channels were expressed by MEL cells and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s. The durations of Vm24 application and the wash-out period were 6 min. and 3.5 min., respectively.

Fig. 11: **Vm24 does not block or inhibit a variety of biologically important ion channels.** Current traces recorded before the application of the toxin (control), following the equilibration of block by 10 nM Vm24 and following wash-out (wash) of the toxin are shown. A) rKv2.1 channels were expressed by Cos-7 cells and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 30 s. The durations of Vm24 application and the wash-out period were 7 min. and 3 min., respectively. B) hERG channels were expressed by HEK cells and currents were evoked by a voltage step to +20 mV followed by a step to -40 mV during which the peak current was measured. The holding potential was -80 mV, pulses were delivered every 30 s. The durations of Vm24 application and the wash-out period were 5 min. and 2.5 min., respectively. C) hBK ($K_{Ca}1.1$) channels were expressed by tsA-201 cells and currents were evoked by a voltage step to +50 mV preceded by a 10-ms hyperpolarization to -120 mV from a holding potential of 0 mV. Pulses were delivered every 5 s. The durations of Vm24 application and the wash-out period were 4 min. and 1 min., respectively. D) Na_v1.5 channels were expressed by Cos-7 cells and currents were evoked by voltage steps to 0 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s. The durations of Vm24 application and the wash-out period were 1 min and again 1 min, respectively.

Fig. 12: **Selectivity profile of Vm24.** Bars indicate the remaining current fractions at equilibrium block of the indicated channels by Vm24 applied in 1 nM (A) or 10 nM concentration (B). Data is presented as mean ± SEM, for n≥3 independent experiments. For the expression systems and the calculation of RCF and other conditions see details in legends to Figs. 9-11.

Fig. 13: **High affinity block of hKv1.3 channels by synthetic Vm24.** A) Whole-cell potassium currents through hKv1.3 channels were evoked from a human T cell in response to depolarizing pulses to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 30 s. Currents recorded in the absence of the peptide (control, indicated by arrow) are substantially blocked (>90%) when 100 pM synthetic Vm24 (sVm24) is administered to the cell via the perfusion of the extracellular medium. Arrow indicates the 1st pulse in sVm24. B) Normalized peak currents as a function of time are shown following the application of 100 pM of sVm24. Arrow indicates the start of the application of the toxin. No significant recovery from block is achieved when the cell was perfused with sVm24-free solution (arrow indicates the start of the wash-out period). C) Bars indicate the remaining current fractions at equilibrium block of hKv1.3 by sVm24 and Vm24 applied in 100 pM concentration. Data is presented as mean ± SEM, for n≥3 independent experiments. For the expression system, the calculation of RCF and other conditions see details in legends to Figs. 9-11.

Fig. 14: **Vm23 is selective for hKv1.3.** Current traces recorded before the application of the toxin (control), following the equilibration of block by 10 nM Vm23 and following wash-out (wash) of the toxin are shown. Ion channels significantly blocked by Vm24 in 10 nM concentration were selected for pharmacological profiling of Vm23. A) hKv1.3 channels were expressed endogenously by peripheral blood lymphocytes and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s. Equilibrium block developed in 3.5 min., the duration of the wash-out period was 2 min. B) Ca²⁺ activated K channels of T lymphocytes (hKCa1) were expressed in Cos-7 cells and currents were elicited by voltage ramps from -120 to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s. The durations of Vm23 application and the wash-out period were 3.5 min. and 2 min., respectively. C) mKv1.1 channels were expressed by L929 cells and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s. The durations of Vm23 application and the wash-out period were 3.5 min. and 1 min., respectively. D) hKv1.2 channels were expressed by Cos-7 cells and currents were evoked by voltage steps to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s. Equilibrium block developed in 3.5 min., the duration of the wash-out period was 2 min.

Fig. 15: **Selectivity profile of Vm23.** The bars indicate the remaining current fractions at equilibrium block of the indicated channels by Vm23 applied in 10 nM concentration. Data is presented as mean ± SEM, for n≥3 independent experiments. For the expression systems and the calculation of RCF and other conditions see details in legends to Figs. 9 and 14.

Fig. 16: **Delayed-type hypersensitivity (DTH) response in rats.** Two groups of 3 rats each were sensitized and challenged by application of DNFB. One group received an injection of PBS alone (control, number 1) and the other received a single injection of 10 micrograms Vm24 (group 2). The ear measurements were taken 24 hours after this treatment. The control bar shows the thickness of the ears after challenging with DNFB for the control rats, whereas the bar corresponding to the treatment group (group 2) shows the thickness of the ears of the rats that were treated with Vm24. Approximately 60% decrement on the inflammation was observed in the rats receiving Vm24, when compared to the control rats.

EP 2 158 213 B1

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

[0025] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by those of ordinary skill in the art to which this invention belongs. As used herein, the following terms have the meanings ascribed to them unless specified otherwise. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein may be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are described. For purposes of the present invention, the following terms are defined below.

[0026] In the present invention the terms "peptide", "polypeptide" and "protein" are used indistinctly to refer the peptide molecules of the present invention.

[0027] The term "Kv1.3 potassium channel blocking activity" generally refers to the actual estimation of the degree of inhibition of the flow of potassium ions through the said Kv1.3 channels, caused by the presence of a Kv1.3 potassium channel inhibitor.

[0028] The term "Kv1.3 potassium channel blocker" generally means a substance that inhibits flow of potassium ions through a Kv1.3 channel of the cell membrane that contains said channel, by directly occluding the ion conduction pathway.

[0029] The term "analog" generally means any polypeptide chain that shares at least 83% pairwise sequence identity over the 36 aligned positions of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3 (30 match over 36 positions). It could include, but is not restricted to, up to six amino acid changes, one or more non-natural amino acid residues, chemical derivatization of one or more of the residues, and N-terminal and/or C-terminal extensions either by other amino acid residues or other organic moieties.

[0030] The term "pairwise sequence identity percentage" generally means the coefficient between amino acid residue positions that have the same amino acid in two aligned sequences over all positions when the two protein sequences are aligned.

[0031] The term "functional equivalent" generally means any molecular structure which displays similar affinity and selectivity towards Kv1.3 as set forth SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, providing it shares the same structural determinants of affinity and/or specificity that confers the high affinity and selectivity towards Kv1.3 channels to these sequences. It could be either an analog or peptidomimetic.

[0032] The term "structural determinants of affinity and/or specificity" generally means all the functional groups and their three dimensional positions on the polypeptide structure which confers SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 with high affinity and specificity towards hKv1.3 channels. These structural determinants of affinity and specificity can be related to the same, partially overlapping or different amino acid residues.

[0033] The term "functional group" generally means a given chemical moiety within SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, either in the main polypeptide chain or in the side chains of its amino acid residues, which makes specific and strong contacts with hKv1.3 channels, hence determining the affinity and selectivity of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 towards hKv1.3 channels.

[0034] The term "functional equivalent analog" generally means any polypeptide chain that shares at least 83% pairwise sequence identity over the 36 aligned positions of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3 (30 matches over 36 positions). It could include, but is not restricted to, one or more non-natural amino acid residues, chemical derivatization of one or more of the residues, and N-terminal and/or C-terminal extensions either by other amino acid residues or other organic moieties, which display similar affinity and selectivity towards hKv1.3 as set forth SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

[0035] The term "peptidomimetic" generally means any chemical compound that displays the same functional groups at similar three dimensional positions as that of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, therefore mimicking the specific contacts of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 with hKv1.3 channels.

[0036] The term "Peptides of the present invention" generally means peptides having a SEQ ID NO:3, with a tertiary structure maintained by four disulfide bridges established to be between pairs of cysteines at positions C6 and C26, C12 and C31, C16 and C33, and C21 and C36, where the letter C stands for the abbreviation of cysteine residues and the numbers correspond to their relative positions in the aligned amino acid sequence. Exemplary preferred peptides are those having a sequence SEQ ID NO:1 (Vm23) and SEQ ID NO:2 (Vm24). Said peptides are capable of blocking with high affinity and specificity the potassium channel Kv1.3. Included are functional equivalent analogs of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, i.e. that share at least 83% pairwise sequence identity over the 36 aligned positions of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3 (30 matches over 36 positions), they conserve the tertiary structure maintained by the four disulfide bridges and they display similar affinity and selectivity towards hKv1.3 as set forth SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

[0037] The term "pharmaceutically acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, buffers and excipients, including phosphate-buffered saline solution, water, and emulsions (such as an oil/water or water/oil emulsion), and various types of wetting agents and/or adjuvants. Suitable pharmaceutical carriers and their

EP 2 158 213 B1

formulations are described in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, 19th ed. 1995). Preferred pharmaceutical carriers depend upon the intended mode of administration of the active agent. Typical modes of administration are described below.

[0038] The term "pharmaceutically acceptable salt" refers to non-toxic acid addition salts, including salts formed with inorganic acids, such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, phosphoric acid, sulfuric acid and perchloric acid, and salts formed with organic acids, such as acetic acid, oxalic acid, maleic acid, malic acid, tartaric acid, citric acid, succinic acid or malonic acid. Other pharmaceutically acceptable salts include inorganic nitrate, sulfate, acetate, malate, formate, lactate, tartrate, succinate, citrate, p-toluenesulfonate, and the like, including, but not limited to, cations based on the alkali and alkaline earth metals, such as sodium, lithium, potassium, calcium, magnesium and the like, as well as non-toxic ammonium, quaternary ammonium, and amine cations, including, but not limited to, ammonium, tetramethylammonium, tetraethylammonium, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, triethylamine, ethylamine, and the like.

[0039] The term "pharmaceutical composition" means a composition suitable for pharmaceutical use in a subject, including a mammal subject or a human subject. A pharmaceutical composition generally comprises an effective amount of an active agent and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0040] The term "effective amount" means a dosage of a particular active agent, in this case a peptide having a Kv1.3 potassium channel blocking activity, sufficient to produce a desired result, for instance suppressing an immune response in a mammal, treating an autoimmune disease in a subject in need thereof, suppressing T-cell activation processes in the immune system of a mammal, attenuating calcium signaling pathways in a T-lymphocyte. The desired result may comprise a subjective or objective improvement in the subject (including cells) which receives the dosage.

[0041] The term "subject" is intended to mean a mammal animal, including a human. Non-human mammals subject to treatment include, for example, cows, sheep, pigs, horses, dogs and cats.

The term "autoimmune disease" generally means a pathological condition driven by immune cells of an organism that affects the homeostasis of said organism.

[0042] The term "autoimmune disease associated to lymphocytes T_{EM}" means any autoimmune disease where the cell that attacks the organism is a lymphocyte T_{EM} cell. Among these diseases are included, but not restricted to: multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia and bone resorption periodontal disease.

[0043] A "prophylactic treatment" is a treatment administered to a subject who does not exhibit signs of a disease or exhibits only early signs of a disease, wherein treatment is administered for the purpose of decreasing the risk of developing a pathologic situation, particularly an autoimmune disease, more specifically an autoimmune disease associated to lymphocytes T_{EM}.

[0044] A "therapeutic treatment" is a treatment administered to a subject who exhibits signs of pathology, wherein treatment is administered for the purpose of diminishing or eliminating those pathological signs, particularly an autoimmune disease, more specifically an autoimmune disease associated to lymphocytes T_{EM}.

[0045] The term "organ" means body systems such as the heart, liver, lung, kidney, brain, adrenal, vascular-endothelial system, immune system, and the like.

[0046] The term "molecular probe" generally means any chemical or biological substance that can be used specifically for identification of target cells, cellular structures, receptors or any molecule to which the probe can bind with high affinity and specificity.

[0047] The term "nonessential amino acid" generally means any amino acid within the SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 that could be changed for any other amino acid without substantially changing the affinity or specificity of the resulting analog towards Kv1.3 channels.

Main findings

[0048] The main subject of this invention refers to two novel peptides (Vm23 and Vm24), their amino acid sequences (SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2), as well as possible functional equivalent analogs, and their potential use as specific immunosuppressant agents. Vm23 and Vm24 are highly selective blockers of potassium ion channels of sub-type Kv1.3, particularly of human lymphocytes (hKv1.3), and were shown *in vivo* to decrease the inflammatory response to delayed-type hypersensitivity reactions in rats, hence these two peptides and their functional equivalent analogs are lead compounds to be used for treatment of some immunological diseases related to abnormal T-cell responses. Before entering into the details of these immunosuppressant agents and their effect on hKv1.3 channels it is important to revise some basic knowledge in this field.

[0049] Regulation of membrane potential of all cells is mainly maintained by the presence of ion-channels permeable to potassium ions, simply called K channels. Individual cells may express several distinct K channels, which can open or close in response to changes in voltage, intracellular calcium levels or specific ligands, although voltage-gated channels are the most common [Gutman et al., 2005]. Among the natural ligands that can modulate the function of K channels are toxins from venoms of bees, scorpions, snakes and sea anemone [Castle et al., 1989; Jouirou et al., 2004; Rodríguez

EP 2 158 213 B1

de la Vega and Possani, 2004]. Examples of such toxins are noxiustoxin from the scorpion *Centruroides noxius* [Carbone et al., 1982], charybdotoxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus* [Miller et al., 1985], Anuroctoxin from the scorpion *Anuroctonus phayodactylus* [Bagdány et al., 2005], BgK from the anemone *Bundosoma granulifera* [Aneiros et al., 1993] and ShK from *Stichodactyla helianthus* [Castaneda et al., 1995]. These toxins have been shown to block a variety of different types and subtypes of K⁺ channels, including Kv1.3; with different affinities and specificities [reviewed by Panyi et al. 2006]. Kv1.3 channel has been implicated in T lymphocyte proliferation and lymphokine production, and blockers of Kv1.3 are of interest as potential immunosuppressants [Panyi et al. 2006].

[0050] Several of these K channel specific toxins have had their three-dimensional structure determined (reviewed in [Mouhat et al., 2004]. Thanks to the solution of the three-dimensional structure of a couple of voltage-dependent K channels that contain sixtransmembrane segments [Lee et al., 2005; Long et al., 2005] and the experiments conducted with double mutants (toxins and channels) by several groups [Goldstein et al., 1994; Stampe et al., 1994; Aiyar et al., 1995; Hidalgo and Mackinnon, 1995] the contact surface of several of these ligands with K channels were identified. Concerning the scorpion toxins known to date, more than 125 different peptides were studied, whose amino acid sequences were reported [Rodríguez de la Vega and Possani, 2004]. These peptides were grouped into 20 different sub-families, based mainly on three criteria: primary sequence similarity, position of the disulfide bridges and specificity of function. For the purpose of the present invention both peptides (Vm23 and Vm24) were isolated, purified, sequenced and assayed. The important originality and proprietary information obtained is the uniqueness of their primary structure and the highly specific function, which is not evident by simple observation of their structural characteristics, but needs experimental evidence of function, both *in vitro* and *in vivo*, as shown and claimed in this invention.

[0051] This work started by the collection of scorpions of the species *V. mexicanus* in the field and the extraction of their venom by electrical stimulation. The scorpions were collected in the State of Morelos, Mexico. The authors have the official authorization for this purpose (document number SGPA/DGVS/02483 of March 18, 2005, given by the *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales* of Mexican Government). Usually 30 scorpions were milked after anesthesia with carbon dioxide (CO₂). The crude venom was either processed immediately or kept frozen at -20 °C until used.

[0052] The soluble venom was subsequently separated by HPLC. The purified peptide, object of this invention, were further assayed *in vivo* using mice as model animals for possible toxic effects (lethality tests), and have had their primary structure determined by Edman degradation and mass spectrometry analysis. The details of these experiments are described in example 1, below.

[0053] Due to the fact that the amount of these peptides is relatively small in the venom, in order to further characterize their functionality and specificity of action on hKv1.3 channels, a substantial amount of Vm24 was chemically synthesized.

Chemical synthesis of Vm24

[0054] Synthesis of a peptide via solid-phase methods includes the use of a solid-phase resin such as but not limited to polystyrene, polyacrylamide, certain fibers or other stable polymers. Derivatization of the solid-phase resin can be produced with a suitable handle such as chlorotriyl chloride, 2-chlorotriyl chloride, hydroxymethylphenil, Sasrin as a mean to produce the C-terminal acid functionally or may be prepared by means of proteolytic stabilization via a resin linker such as but not limited to a 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxyethyl group.

[0055] Chain assembly usually includes any of the protecting group strategies where the amino acid protecting group is either t-butyloxycarbonyl (Boc) or 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (fmoc). The reactive side chains of the various amino acids used for synthesis of the peptide are normally protected. Commonly used protecting groups include: t-butyl, benzyl, trityl, methyltrityl, benzyl-methylbenzyl, tosyl, benzyloxymethyl, t-butyloxycarbonyl, 2-chlorobenzyl, 2-bromobenzyl, methoxybenzyl, formyl, acetomidomethyl, pentamethylchroman sulfonyl, pentamethyldihydrobenzofuran-sulfonyl, nitro for side chain amines, guanidines, phenols, alcohols, acids, imidazoles, thiols, and indoles. Other protecting groups could be invented that accomplish the same goal of eliminating undesirable side reactions during primary chain assembly.

[0056] Synthesis of the amide bond during addition of novel amino acids to the growing peptide may be accomplished by using any of the acid activation methods including but not limited to symmetrical anhydrides (carbodiimide), HOBt esters, acyl fluorides, uronium activators such as but not limited to TBTU, HATU or HBTU, phosphonium activators such as but not limited to BP, PyBOP, PyBrOP. These are all methods of activation of the carboxyl group which those practicing the art of peptide synthesis would be expected to know.

[0057] Synthesis of analog structures which include substitution of unnatural amino acids into the sequences SEQ ID NO:1 (Vm23), SEQ ID NO:2 (V24) or SEQ ID NO:3 (Vm23 and Vm24 consensus sequence) may also be useful for certain embodiments of the invention. The use of convergent methods whereby fragments of the peptide are assembled in a fashion whereby the ultimate product is Vm23, Vm24 or their analogs is also known and can be used by experts in the field. The methods for the cleavage of the synthetic peptide out of the solid support at the end of the synthetic procedure and the correct folding of the disulfide bridges to obtain the sequences SEQ NO.1 and 2 or their analogs are also known and can be reproduced by experts on the state of the art of the subject. Final cleavage and deprotection

EP 2 158 213 B1

and folding of the toxin may be but not limited to either HF or TFA depending on the strategy employed for synthesis. Disulfide bond formation includes any orthogonal approach where differential Cys protection could be used to position the disulfide bonds in the correct form: C6-C26, C12-C31, C16-C33, and C21-C36 linkage for Vm24. However the disulfide bridge formation can also be obtained by air oxidation, or shuffling reactions assisted by the presence of reduced and oxidized glutathione in various proportions.

[0058] Following this basic methodology various naturally-occurring toxins from snake, scorpion and sea anemone were produced synthetically, radiolabeled with ^{125}I and used as molecular probes for investigating potassium channel structure and function [Strong, 1990; Moczydlowski et al., 1998; Garcia et al, 2001, Kem et al., Patent US6,077,680]. Many of these toxins are selective for particular K channel sub-types [Auguste et al., 1990; Galvez et al., 1990; Crest et al., 1992; Garcia-Calvo et al., 1993; Garcia et al, 1994, Kem et al., Patent US6,077,680]. Among the most often used examples are dendrotoxin from the venom of the snake *Dendroaspis polylepsis* [Harvey, 1997], BgK from the sea anemone *Bunodosoma granulifera* [Aneiros et al., 1993; Alessandri Haber et al., 1999] and ShK from the anemone *Stichodactyla helianthus* [Castaneda et al., 1995; Pennington et al., 1995] and several scorpion toxins such as noxiustoxin from *Centruroides noxius* [Drakopoulou et al., 1995] and charybdotoxin from *Leiurus quinquestratus* [Sugg et al., 1990], to mention just a few. Some of these toxins, such as ShK blocks Kv1.3 type K channels in Jurkat T lymphocytes at very low concentrations (< 1 nM). However, many of them suffer from the lack of specificity. That is, at concentrations in the order of 10 to 100 nM they are also able to block other sub-types of channels. Since, as it will be demonstrated in the examples to be described below, Vm23 and Vm24 are exquisitely specific for hKv1.3 channels and have a distinct primary structure from the other peptides described so far in the literature, we decided to prepare Vm24 synthetically.

[0059] The covalent structure of Vm24 was obtained by chemical synthesis according to the solid phase system of Merrifield [Merrifield, 1964], using fmoc-amino acids, as earlier described by our group [Drakopoulou et al., 1995].

[0060] The possibility of substitution of some of the amino acids of the primary structure of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, by other modified amino acids in order to obtain an analog peptide with a higher half life in vivo, thus reducing protease susceptibility of the native peptides is within the scope of the present invention. This may include replacement or substitution of nonessential residues with conservative isosteric replacements; for example: lysine for glutamine or acetyl-lysine, or a neutral amino acid such as alanine, or Na-methylated amino acid substitution in certain positions to reduce proteolytic degradation of the biologically active peptides. Also truncation of the primary sequence, by deletion of certain amino acids nonessential for the function, or addition of extra residues can provide the analog structure with a higher stability in vivo. Some nonessential residues of the peptides of the present invention identified by the alignment of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 include but are not restricted to: those residues in positions No. 10, 13, 17, 23, 29 and 35 of aligned SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 or aligned SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3.

[0061] A functional equivalent analog peptide can be produced by inclusion of selected D-amino acids or by chemical synthesis of a retro-inverse analog, where all residues are D-amino acids and the amino acid sequence is reversed [Jameson et al., 1994; Juwadi et al., 1996]. These modifications could increase the stability of the product.

[0062] Another major approach is the development of low molecular weight compounds based on the structural determinants of affinity and specificity of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 in order to generate non-peptidic (peptidomimetic). In these studies, non-peptidic scaffolds are designed and synthesized, which contain key functional groups from the potassium channel binding surface of the parent polypeptide. There are many examples where naturally occurring low molecular weight, non-peptidic compounds, have been shown to mimic or to antagonize the effect of a polypeptide or protein ligand. Peptidomimetic compounds have been designed and synthesized for a number of therapeutically relevant peptides. A loop present on the CD4 receptor which binds to HIV gp120 protein was designed and synthetically obtained [Chen et al., 1992] and shown to be an effective blocker of gp120 binding to the CD4 receptor at low micromolar concentrations. FTI-276 is another example of a mimetic of the C-terminal region of Ras protein which is a potent blocker of oncogenic Ras signaling [Lerner et al., 1995].

[0063] As it can be deduced from the above described, there are many ways of preparing functional equivalent analogs of these two peptides Vm23 and Vm24 that can be used as leading drugs to control abnormal functions of T lymphocytes. Improper activation of T lymphocytes are known to cause autoimmune diseases (such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia and bone resorption periodontal disease.), and transplant rejection among others.

[0064] In order to test the efficiency of possible new immunosuppressant drugs there are many animal models, which provide adequate *in vivo* assays for testing the efficiency and possible side-effects of a novel unknown compound, as it is the case of the reaction known as delayed type hypersensitivity (DTH-response) in rats, which has been used in the present invention. As it will be shown and discussed below, to assess the protective effect of the peptides of the present invention, small doses of Vm24 was tested to control the inflammatory reaction that occurs in the ear of rats previously sensitized with dinitrofluorobenzene (DNFB). This assay has been widely used and is accepted as adequate model for the purposes of the present invention [Phanuphak et al., 1974].

EP 2 158 213 B1

Immunosuppressant

[0065] Immunosuppressants such as cyclosporin and FK506 exhibit severe side effects which limit their therapeutic use. Research conducted with these two compounds was able to identify at least some of the molecular mechanisms being responsible for undesirable side-effects upon the administration of these drugs. Cyclosporin interacts with the protein cyclophilin which is present in many different tissues, whereas FK506 causes toxicity because it targets the FK-binding protein, also found in many different tissues. There has therefore been a major effort to identify novel immunosuppressants without serious side-effects. One of the main goals is to identify novel targets expressed principally in T-lymphocytes, such as the Kv1.3 ion-channel. The Kv1.3 potassium channels expressed in T-lymphocytes are very important for certain cellular functions, although RNA coding for this protein is also found in other cells (B-lymphocytes, microglia, macrophages, osteoclasts, platelets and some brain cells). However, only in T-lymphocytes, Kv1.3 dominates the membrane potential and has its blockade significant functional consequences. Due to the distinct mechanism of action of Kv1.3 blockers and the relatively restricted tissue distribution of Kv1.3 channels, a specific and high affinity blocker of Kv1.3 is expected to display less toxic side-effects than cyclosporin and FK-506, hence, it may prove useful for treatment of autoimmune diseases as well as for transplantation therapy.

[0066] Scientists from Merck Sharpe and Dohme have shown that margatoxin (another scorpion toxin peptide) has a potent effect as blocker of the Kv1.3 channel and it is capable of suppressing the immune response in an animal model (pig). However, margatoxin is not specific for Kv1.3 channels, but also affects the Kv1.2 channel with similar potency. Since the heart and brain tissues also express Kv1.2 channels, its blockage might have serious deleterious effects. Another peptide isolated from sea-anemone, ShK is a potent blocker of Kv1.3 (see Kem et al., 2000, patent US6,077,680), that also affects other related Kv1 channels but more than one hundred fold higher concentration is needed for a similar blockade. It means that the related channels are >100-fold less sensitive to its application, when compared to Kv1.3. Peptides Vm23 and Vm24, object of this invention, are from a different biological source, have a distinctly different primary structure from that of ShK and are more specific for hKv1.3 channels than ShK. Vm23 and Vm24 blocks $\leq 50\%$ of a couple of other K channels when applied at a concentration more than 3000 times higher than what is needed to block the same fraction of hKv1.3 channels, as it will be shown and discussed in detail in the examples below (examples 7 to 10).

[0067] This invention also comprises the production of Vm23, Vm24 and their functional equivalent analogs by the solid-phase method. The procedures used for chemical synthesis include a series of well known protocols to experts in the field, as detailed within the description of example 3.

Electrophysiological characterization

[0068] The development of an efficient immune response against foreign or autoantigens requires the activation and proliferation of lymphocytes specific for a given antigen. This requires a well-coordinated interplay between different cellular components of the immune system. The first step in this process is the presentation of the processed antigens to lymphocytes by professional antigen presenting cells [Janeway et al., 2001]. Within the subject of the present invention is the regulation of T-lymphocyte mediated immune responses (e.g. delayed-type hypersensitivity) by blockers specific for the voltage-gated K channel, Kv1.3. Thus we restrict the elaboration of the involvement of K channels in lymphocyte activation to T cells. However, we should mention that proliferation of certain subsets of B lymphocytes also depend on the activity of Kv1.3 channels [Wulff et al., 2004].

[0069] Recognition of the presented antigen by the antigen receptor of T cells leads to the activation, proliferation and terminal differentiation of the cells [Sallusto et al., 2004]. Transmembrane signaling pathways triggered by antigen recognition include the activation of several protein kinases and consequently that of phospholipase C- γ (PLC- γ). Generation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) by PLC- γ -mediated hydrolysis of the membrane phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) initiates the biphasic Ca^{2+} signal required for commitment to proliferation in T cells [Lewis, 2001]. IP3 diffuses and binds to its receptors in the endoplasmic reticulum (ER), which results in the release of Ca^{2+} into the cytosol and a significant rise in the cytosolic free calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). The transient rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ following the release from the ER is not sufficient for the execution of the signal transduction cascade, a sustained Ca^{2+} signal is necessary. This is realized by Ca^{2+} influx from extracellular space through Ca^{2+} channels in the plasma membrane through calcium-release activated Ca^{2+} channels (CRAC channels) [Zweifach and Lewis, 1993].

[0070] Although CRAC channels are inherently voltage-independent, the Ca^{2+} current is sensitive to the electrochemical gradient for Ca^{2+} , which is influenced by the membrane potential of the cells [Panyi et al., 2004]. The depolarizing Ca^{2+} influx has to be counterbalanced by the activation of K channels to clamp the membrane potential at negative values and thus, to provide a sufficient driving force for further Ca^{2+} entry [Fanger et al., 2001]. Selective, regulated K^+ efflux is one of the major determinants of the membrane potential of human T lymphocytes, which is around -50 to -60 mV. Two types of K channels conduct outward K^+ fluxes under physiological conditions in these cells. The dominant voltage-gated K channel in human T lymphocytes, Kv1.3, opens upon membrane depolarization with an activation

EP 2 158 213 B1

threshold close to the resting potential of the cells [Matteson and Deutsch, 1984]. The Ca^{2+} -activated potassium channel of human T cells, IKCa1 (or $K_{Ca3.1}$), is activated solely by the rise of the cytosolic free calcium concentration over ~200 nM, independently of the membrane potential [Grissmer et al., 1993].

[0071] The contribution of Kv1.3 and IKCa1 channels to the membrane potential control of T cells depends on the activation status of the cells (resting vs. activated) and their functional role in the immune system determined by the degree of terminal differentiation of the T cells [Wulff et al., 2003], as described in details in the section of Background of the Invention. From the point of therapeutic applicability of Kv1.3 blockers in autoimmune diseases it is important to emphasize that selectivity for Kv1.3 channels over IKCa1 channels is of utmost importance [Wulff et al., 2003]. Effector memory T cells (T_{EM}), which mediate tissue damage in e.g. multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia and bone resorption periodontal disease., selectively upregulate Kv1.3 channels upon activation, and thus, the membrane potential control of these cells is governed solely by Kv1.3 channels [Beeton et al., 2006]. Consequently, the proliferation of these cells can be suppressed effectively and persistently by selective Kv1.3 inhibitors [Wulff et al., 2003; Vennekamp et al., 2004; Beeton et al., 2005]. On the contrary naive and central memory T cells (T_{CM}) escape from Kv1.3 block-mediated inhibition of proliferation [Wulff et al., 2003] by transcriptional up-regulation of IKCa1 [Ghanshani et al., 2000]. The proliferation of these pre-activated cells becomes sensitive to IKCa1 inhibitors, but not to Kv1.3 inhibitors. Thus, a Kv1.3-based therapy that suppresses the activation of T_{EM} cells without significant impairment of the proliferation of naive and T_{CM} cells might have use in the management of autoimmune diseases, particularly autoimmune diseases associated to lymphocyte T_{EM} , such as type I diabetes mellitus [Viglietta et al., 2002; Beeton et al., 2006], rheumatoid arthritis [Beeton et al., 2006], multiple sclerosis, inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease [Valverde et al., 2004] and conditions associated to organ rejection, such as chronic graft rejection and graft-versus-host disease which are proposed to be sustained by chronically activated T_{EM} cells [Yamashita et al., 2004].

Assessing selectivity

[0072] Several high affinity peptide blockers of Kv1.3 are selective for Kv1.3 over IKCa1, similarly to Vm24. These include scorpion toxins, e.g. Mrgatoxin (MgTx), Noxiustoxin (Ntx), Kaliotoxin, Anuroctoxin and ShK toxin isolated from sea anemone. However, ion channels important in neuronal and muscle excitability are also inhibited by these toxins with nanomolar-picomolar affinities, e.g. Kv1.1 by ShK [Kalman et al., 1998] and Kaliotoxin [Grissmer et al., 1994], whereas Kv1.2 is blocked by MgTx [Koch et al., 1997], Ntx [Grissmer et al., 1994] and Anuroctoxin [Bagdany et al., 2005].

[0073] The lack of specificity of the toxins imposes the possibility of significant biological effects. Ion channels of the Kv family are widely distributed in classically excitable and non-excitable cells (see [Gutman et al., 2005] for a comprehensive review). In neurons, skeletal and cardiac muscle cells these channels are critical determinants of electrical excitability. They contribute to the maintenance of the resting membrane potential, the shaping of the action potentials by influencing the rate of repolarization, and determine the spike frequency and neuronal after hyperpolarization (see [Gutman et al., 2005] for a comprehensive review). Ion channels expressed in the central nervous system are more protected against systematically applied toxins due to the blood-brain barrier, however, in multiple sclerosis, which is a potential application area of Kv1.3 inhibitors, this barrier is compromised which leads to neural toxicity in animal models of MS [Beeton et al., 2005]. Due to the direct contact of the cells with the blood stream cardiac myocytes are more susceptible to the potential side-effect of a non-selective Kv1.3 inhibitor. In human atrial myocytes Kv1.5 [Feng et al., 1997] and in ventricular myocytes Kv1.4 [Patel and Campbell, 2005] and hERG (reviewed in [Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006]) channels determine critically the repolarization phase of the action potential, whereas $Na_v1.5$ is responsible for the depolarization phase [Rogart et al., 1989]. BK Ca^{2+} -activated K channels are ubiquitous in the human body (brain, skeletal muscle, smooth muscle, pancreatic islet cells, etc, reviewed in [Wei et al., 2005]) and regulate a variety of physiological functions including electrical excitability of neurons and skeletal muscle cells and Ca transients in smooth muscle. The BK channels are blocked by toxins in the α -KTx1.x family (e.g. charybdotoxin [Miller et al., 1985]).

[0074] The availability of the X-ray crystallographic structure of a bacterial [Doyle et al., 1998] and a human voltage-gated K channel [Long et al., 2005] significantly expanded our understanding of the molecular basis of α -KTx specificity for different ion channels over the last decade [Giangiacomo et al., 2004], however, to date, prediction for the selectivity profile of a given peptide toxin based on its primary structure is not possible. This substantiates the experimental determination of the selectivity of Vm 24 against ion channels having biological significance and known susceptibility to block by animal toxins.

[0075] The advancement of molecular biology and the cloning of ion channel genes allow the pharmacological studies to be conducted on recombinant ion channels. The expression of recombinant channels in suitable cell lines provides several advantages for pharmacological experiments, e.g. the magnitude of contaminating currents is negligible and the amplitude of the currents is suitable for pharmacological assays. Furthermore, the expressed recombinant channels maintain the pharmacological characteristics of the channels expressed in native cells.

EP 2 158 213 B1

Pharmaceutical compositions

[0076] The invention provides pharmaceutical compositions comprising the peptides of the present invention. As already mentioned, these peptides are useful for suppressing an immune response in a mammal where a specific subset of T-cells is activated. In particular, pharmaceutical compositions comprising the peptides of the present invention are useful for treating or preventing a condition wherein the immune response is the result of heterologous organ rejection (by instance a heart, a lung, a liver, a kidney or a pancreas) or the result of an autoimmune disease associated to lymphocytes T_{EM} .

[0077] In a preferred aspect of the invention, the pharmaceutical compositions comprise the peptides of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. The preferred form of these pharmaceutical compositions and the selection of the pharmaceutically acceptable carrier depend on the intended mode of administration and therapeutic application. The pharmaceutical compositions include (depending on the formulation desired) pharmaceutically acceptable, non-toxic carriers or diluents, which are defined as vehicles commonly used to formulate pharmaceutical compositions for animal or human administration. Additionally and optionally, the pharmaceutical compositions may also comprise at least one additional immunosuppressive agent, which may have a complementary effect in the treatment. Some illustrative immunosuppressive agents are cyclosporine, rapamycin, azathioprine, prednisone, ShK toxin, ShK derivatives and deoxyspergualin, their derivatives, or a salt thereof. The pharmaceutical compositions of the present invention can be administered as mentioned below.

Therapeutic and prophylactic methods

[0078] This invention provides compositions for use in methods for therapeutics or prophylactic treatment of conditions where the suppression of an immune response in a mammal is required, especially when T-cells are activated in subjects in need of such treatment, wherein said conditions include heterologous organ rejection (for instance a heart, a lung, a liver, a kidney or a pancreas) or autoimmune diseases (for instance multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia and bone resorption periodontal disease.). These subjects may include humans and other mammals, such as dogs, cats, goats, cows, horses, pigs, sheeps, to mention a few of them. In one aspect, the present invention provides compositions for use in methods for the prophylactic or therapeutic treatment of conditions that are treatable by, responsive to, or sensitive to the inhibition of Kv1.3 potassium channels in cell membranes of T-cells of subjects in need of such treatment. These methods comprise administering to a subject in need thereof, including a human, an effective amount of a peptide of the present invention as described above. Generally, this peptide may comprise peptides Vm24 with a SEQ ID NO: 1, Vm23 with a SEQ ID NO: 2 or a peptide having a sequence SEQ ID NO: 3, or functional equivalent analogs thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[0079] In a preferred embodiment, the present invention provides compositions for use in methods specifically directed to treating and preventing autoimmune diseases associated with T-cell activation or responsive to the Kv1.3 potassium channels inhibition. Such autoimmune diseases include but are not limited to multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia and bone resorption periodontal disease. These methods comprise administering to a subject in need thereof, including a human subject, an effective amount of a peptide of the present invention as described above.

[0080] In another preferred embodiment, the present invention provides compositions for use in methods specifically directed to treating and preventing the rejection of a heterologous organ (by instance a heart, a lung, a liver, a kidney or a pancreas). These methods comprise administering to a subject in need thereof (i.e. a subject who will receive or has receipt an organ transplantation), including a human, an effective amount of a peptide of the present invention as described above.

Dosages and methods of administration

[0081] In therapeutic applications, a peptide of the invention is suitable for administration to a subject already suffering from a disease or an undesirable condition (e.g., autoimmune disease or heterologous organ rejection, respectively), in an amount sufficient to treat, cure, partially arrest, or detectably slow the progression of the disease and its complications. An amount of a peptide of the invention effective for use in therapeutic applications will depend upon the severity of the condition, the general state of the subject, and the route of administration. The effective amount of the peptide in therapeutic applications will generally be within a range from about 0.1 microgram per kilogram to about 10 microgram per kilogram of the peptide (or a pharmaceutically acceptable salt thereof) per dose.

[0082] In prophylactic applications, the subject peptides or pharmaceutical compositions thereof are suitable for administration to subjects at risk of, but not already suffering a disease or an undesirable condition. The effective amount of peptide suitable to be administered will depend upon the subject's state of health and general status of the immune

EP 2 158 213 B1

system. The effective amount of the peptide for use in prophylactic applications will generally be within a range from about 0.1 microgram per kilogram to about 10 microgram per kilogram of the peptide per dose.

[0083] The suitable route of delivery of the peptides and pharmaceutical compositions of the present invention is determined by the disease or clinical indication and the site where treatment is required. For a certain type of disease, limited to a restricted area of the body, it may be desirable to apply the peptide or composition thereof at the local site (topical application). Alternatively, with the progression of the disease or simultaneously to the topical application it might be desirable to administer the peptide or composition systemically.

[0084] For other indications peptides and pharmaceutical compositions of the invention may be suitable for delivery by intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal, and intradermal injection, as well as by intra-bronchial instillation (e.g., by using a nebuliser), and transmucosal, systemic, transdermal (e.g., with a lipid-soluble carrier in a skin patch), oral, and gastrointestinal delivery (e.g., with a capsule or tablet).

[0085] One or more peptides of the invention may be suitable for administration in combination therapy. For example, one or more subject peptides may be suitable for administration in combination with another immunosuppressant agent (such as those above mentioned) to a subject in need of such treatment. There are some idiopathic autoimmune diseases, such as immune thrombocytopenic purpura [Cooper and Busnel, 2006] or autoimmune lymphoproliferative syndrome [Oren et al., 2002], where the treatment could require a multitarget approach, therefore more than one immunosuppressant substance is needed.

[0086] The peptides of the invention may be suitable for administration alone or in combination with a pharmaceutically acceptable carrier as described above in the "Pharmaceutical compositions" section. The peptides may be suitable for administration in single or multiple doses. Suitable pharmaceutical carriers include inert solid diluents or fillers, sterile aqueous solutions, and various nontoxic organic solvents. The pharmaceutical compositions formed by combining a subject peptide with a pharmaceutically acceptable carrier may be readily suitable for administration in a variety of dosage forms such as tablets, lozenges, syrups, injectable solutions, and the like. If desired, the pharmaceutical carriers may contain additional ingredients, such as flavorings, binders, excipients, and the like.

[0087] For oral administration, tablets containing various excipients, such as sodium citrate, calcium carbonate, and calcium phosphate, may be employed along with various disintegrants, such as starch, and preferably potato or tapioca starch, alginic acid, and certain complex silicates, together with binding agents, such as polyvinylpyrrolidone, sucrose, gelatin, and acacia. Lubricating agents, such as magnesium stearate, sodium lauryl sulfate, and talc are also added for tableting purposes. Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in salt and hard-filled gelatin capsules. Preferred materials for this purpose include lactose or milk sugar and high molecular weight polyethylene glycols. When aqueous suspensions of elixirs are desired for oral administration, the essential active peptide ingredient therein may be combined with various sweetening or flavoring agents, colored matter or dyes, and, if desired, emulsifying or suspending agents, together with diluents such as water, ethanol, propylene glycol, glycerin, and combinations thereof.

[0088] Solutions of the peptides of the present invention are suitable for parenteral administration, for example in sesame or peanut oil or in aqueous polypropylene glycol, as well as in the form of sterile aqueous saline solutions of the corresponding water soluble pharmaceutically acceptable metal salts previously described. Such an aqueous solution should be suitably buffered if necessary, and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, and intraperitoneal injection. The sterile aqueous media employed are all readily obtainable by standard techniques well known to those skilled in the art. Additionally, the aforesaid compounds may be suitable for administration topically (for example, through a placed catheter) by using an appropriate solution suitable for the particular purpose.

Vm23, Vm24 and functional equivalent analogs as molecular probes

[0089] Beside the therapeutic use of the peptides of the present invention, these peptides could be used to detect and characterize the level of Kv1.3 channels expression in a broad variety of cells, either obtained from animal tissues or stable cultures. The importance of characterizing Kv1.3 expression in T cells has already been highlighted in this document, therefore this invention also relates to the use of the peptides of the present invention as molecular probes to physiologically characterize Kv1.3 channel-expressing cells. The detection and characterization of Kv1.3 expression can be done by several detection techniques using conveniently labeled peptides of the present invention, including but not restricted to: flow cytometry, confocal and conventional fluorescence microscopy, total fluorescence emission, radioactive binding and displacement techniques and immunological pull-down assays. Quantitative determination of Kv1.3 channels expressed in a given cell can be performed by quantitative detection techniques, including but not restricted to: channel counting by confocal laser scanning microscopy, immunogold detection and radioactive binding and displacement techniques. Moreover, chemical modifications of the polypeptide chain or side-chains of several nonessential amino acids could provide labeled functional equivalent analogs that could be used for Kv1.3 channel detection and quantification. In turn, these functional equivalent analogs could be used as molecular probes to search for specific ligands, providing these new ligands share the same binding site on Kv1.3 as Vm23, Vm24 and their functional equivalent

EP 2 158 213 B1

analog. Any such chemical modification should leave unmodified the structural determinants of Vm23, Vm24 and their functional equivalent analogs which confer them with high affinity and specificity towards Kv1.3. Chemical modification of polypeptide chains is a common procedure for obtaining useful molecular probes; it can be achieved by several widely available methods and is regularly used by experts in this field. The label provided by the modification could include, but is not restricted to, radioactive isotope, fluorescent, chemiluminescent or chromogenic moieties and crosslinking or fusion with tag proteins (antibodies, biotin, green fluorescent protein or its derivatives).

[0090] In the following examples it is described in detail how these new peptides of the present invention, were isolated, purified and chemically characterized. The synthesis of an exemplary peptide, Vm24, is described, and the selective action of two exemplary peptides of the present invention (Vm23 and Vm24) on Kv1.3 channels of human T-lymphocytes is thoroughly described. Finally, the protective action of Vm24, at low concentration in the *in vivo* assay for DTH-response in rats is also described.

EXAMPLES

[0091] The following examples are included to demonstrate typical preferred embodiments of the invention. If the final products comprise the sequences shown here (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3) or their functional equivalent analogs, they are bound to reproduce the same results as those described here and thus are expected to function well in the practice of the invention claimed here

Example 1. Isolation, lethality test in mice and primary structure determination of Vm23 and Vm24

[0092] All solvents and chemicals used were analytical grade and double-distilled water was used throughout the procedure as earlier described [Batista et al., 2007].

Isolation procedures

[0093] The procedures used for isolation of the various natural ligands mentioned above make use of chromatographic techniques. The venom was solubilized in water and centrifuged at 10,000 x g for 5 min. The supernatant was recovered and separated by high performance liquid chromatography (HPLC). One hundred microliter containing 1.0 milligram of the soluble venom protein was applied to an analytical C18 reverse-phase column (dimensions 10 x 250 mm, catalog number 238TP) obtained from Vydac (Hisperia, CA, USA), of a HPLC system (Millenium Millipore, Milford, MA). Components were purified using a linear gradient from solution A (0.12% trifluoroacetic acid - TFA in water) to 60% solution B (0.10% TFA in acetonitrile), run for 60 min. The detection was monitored by absorbance at 230 nm and eluted at 1 ml/min flow-rate. Fractions were collected manually and dried using a Savant Speed-Vac drier. As shown in Fig.1 more than 80 distinct fractions were collected from this HPLC separation. Fractions that elute from 20 to 35 min retention times usually correspond to the elution time of most K channel scorpion specific toxins of other scorpion venoms studied [Batista et al., 2007]. For this reason special attention was dedicated to the venom components eluting at those times. Specifically, two fractions: one eluting at 23 and another at 24 minutes were further analyzed, because mass spectrometry determination of peptides from this elution times were closely related to the values found for other known K channel specific toxins, v.g., they had molecular masses around 4,000 Daltons. Since these components were still not homogeneous, a second chromatographic separation was conducted using the same HPLC system but eluted with a distinct gradient (solvent A to 40% solvent B for 60 min, using a C18 column, catalog number 218TP54 from Vydac, Hisperia CA). As shown in the inserts of Fig.1, a major component was isolated from each one of these initial fractions (labeled with asterisk). The insert of the left side corresponds to the fraction eluting at 23 min and that on the right to the fraction eluting at 24 min. Under analysis by mass spectrometry determination and sequencing by automatic Edman degradation both peptides were found to be homogeneous. The one eluting at 24 min in our experimental conditions was analyzed first. It was pure and showed a molecular mass of 3864 atomic mass units (a.m.u.). In this document we will use interchangeably a.m.u. or Daltons (abbreviated Da) for designating one unit of molecular mass. For this reason the peptide was named Vm24, which stands for peptide of the venom from *V. mexicanus* that elutes at 24 min in our experimental conditions. The chromatogram shown in the insert of the left side (Fig.1) corresponds to the separation of the peptide named Vm23. It stands for peptide of the venom from *V. mexicanus* that elutes at 23 min. The experimental molecular mass for this component was determined to be 3665 Da.

In vivo determination of toxicity of whole venom from V. mexicanus and lethality tests of purified Vm23 and Vm24

[0094] The effect of venoms and pure peptides is usually conducted in the laboratory using at least three biological models: mammals, crickets and crustaceans, since it is known that scorpion venom contains toxins species specific. There are toxins specific for mammals or for different types of arthropods (reviewed in [Possani et al., 1999]). For the

EP 2 158 213 B1

purpose of this invention we conducted experiments using mice as the animal model, because the results would be a reliable indication of what could happen with humans in contact with the venom or purified toxins. Mice injected with various amounts of soluble venom (from 50 to 200 microgram protein per mouse of 20 gram body weight) of *V. mexicanus* showed no symptoms of intoxication. Usually if the venom contains toxins to humans with these amounts of material a clear symptom of intoxication would have been seen, such as excitability, salivation, respiratory distress (dyspnea) paralysis of rear limbs, diarrhea, convulsions, or even death [Possani et al., 1985]. The peptide is said to be "toxic" if the injected animal presents any of the above symptoms, but recovers within 24 hours following the administration of the peptide, whereas if the mouse died it is called "lethal". Non-toxic components are those that induce no symptoms of intoxication and produce similar behavior as mice injected with PBS-saline solution, pH 7.2 [Possani et al., 1985]. Eventually the whole venom at relatively low dosage is not toxic, but purified peptides at similar doses can induce symptoms of intoxication, because during purification the sample is enriched in that particular component. For this reason and taken into consideration that the soluble venom of *V. mexicanus* was not toxic at 200 microgram/ 20 gram mouse weight, the pure peptide Vm24 was injected into mice at various concentrations. The highest dose used was 200 microgram/20 grams, that is: 10,000 milligram/kilogram mouse weight and no symptoms of intoxication were observed. [0095] This is certainly in contrast with lethal components, such as toxin Cn2, purified from another Mexican scorpion *Centruroides noxius*. The fifty percent lethal dose (LD₅₀, meaning the dose that causes 50% mortality in a group of animals assayed) for Cn2 in mice is 0.25 microgram/20 gram mouse weight [Zamudio et al., 1992]. It means that Vm24 at an 800-fold higher protein concentration is not toxic to mice, whereas Cn2 kills half the population.

20 Determination of the amino acid sequence of Vm23 and Vm24

[0096] Two techniques were used: automatic Edman degradation and mass spectrometry (MS) analysis. Direct amino acid sequence determination of pure toxin was performed using a Beckman LF 3000 Protein Sequencer (Palo Alto, CA, USA) with chemicals and procedures provided by the company. A reduced and alkylated sample of the pure peptide was enzymatically cleaved with Arg-C endopeptidase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), using similar procedures as earlier described for other scorpion components [Valdez et al., 2004; Batista et al., 2007; Diego-Garcia et al., 2007]. The corresponding peptides were purified by HPLC and sequenced. For mass spectrometry the samples were directly applied into a Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer (San Jose, CA) using a Surveyor MS syringe pump delivery system. The eluate at 10 microliter/min was split in order to allow only 5% of the sample to enter the nanospray source (0.5 microliter/min). The spray voltage was set at 1.7 kV and the capillary temperature at 130°C. For MS/MS experiments, the fragmentation source was operated with 25 V of collision energy, 35-45% (arbitrary units) of normalized collision energy and the scan with wide band activated. All spectra were obtained in the positive-ion mode. The data acquisition and the deconvolution of data were performed with the Xcalibur software on a Windows NT PC system. The MS/MS spectra from peptides enzymatically generated were analyzed manually and by the Sequest software [Batista et al., 2007].

[0097] The primary structures of both Vm23 and Vm24 (see Fig.2) were determined, and the peptides were used for electrophysiological experiments as described below (see accompanying examples 7 to 10 of this invention). The native peptide re-purified from the fraction eluting at 23 min (see inset left in Fig.1) was fully characterized. Its experimental molecular mass was found to be 3665 Da. One nanomole of this peptide was loaded into the sequencer and the first 34 amino acids were directly identified by Edman degradation (underlined Direct). Cysteine residues were confirmed by reduction and alkylation, using the methodology given by the company (Beckman). The last residue of Vm23 in position 35 was determined by mass spectrometry. The expected theoretical average molecular mass based on the sequence determined was 3665.51 Da, thus confirming the unequivocal determination of the full sequence. Both the experimentally determined and the expected theoretical molecular masses were the same, within the error of the apparatus used (Finnigan ion trap LCQ^{DUO} mass spectrometer).

[0098] Similarly, one nanomole of the homogeneous peptide Vm24 (re-purified as shown in the inset to the right of Fig. 1) was submitted to automatic Edman degradation, which allowed the identification of the first 28 amino acid residues (Fig. 2, labeled Vm24). Analysis conducted with various aliquots of the reduced and alkylated peptide was used for confirmation of the cysteine residues and for digestion with endopeptidases. The digestion of Vm24 with ArgC-endopeptidase produced three sub-peptides, one that confirmed the sequence from residues Ala1 to Arg17 (not indicated in the figure because it comprises the same N-terminal sequence already determined when analyzing the native peptide - underlabeled "direct"); another from Ala18 to Arg29 indicated by the underlabeled "Arg-C1", and the last one from Lys30 to Cys36 (underlined Arg-C2). These sequences were obtained by Edman degradation in combination with MS/MS fragmentation (see Fig.2, Vm24). Since the last residues were identified by CID (collision induced fragmentation), the amino acids in positions 30 and 32 could have been either lysine or glutamine (same molecular masses). In order to solve the ambiguity an additional enzymatic cleavage of this last sub-peptide with trypsin was conducted. Three small peptides were separated by HPLC, whose amino acid sequences determined by CID were identified to be from positions Cys26 to Lys30 (underlined Trp1), Cys26 to Lys32 (not indicated, for simplification of notation) and Cys33 to Cys36 (also not indicated). Since trypsin cleaves the peptide bonds at the C-terminal of lysines, these two positions were

EP 2 158 213 B1

assigned to be lysine residues, solving unambiguously the full sequence. The last four amino acids at the most C-terminal were also identified by MS/MS fragmentation of a peptide isolated after hydrolysis with Lys-C endoprotease (underlabeled Lys-C). The theoretical average molecular mass of the expected peptide, assuming an amidated C-terminal amino acid was 3863.64 Da and the value found experimentally was 3864.0 Da, confirming the full sequence. Since the accuracy of the three-dimensional ion-traps is in the range of 100 ppm for peptides under 1,000 Da, the small difference of 0.36 units is within the expected value (for reference on the accuracy of the equipment see [Aebersold and Goodlett, 2001]). [0099] Relevant for this invention is important to highlight five characteristics of Vm23 and Vm24:

1) Their primary structures compared with all the other scorpion toxins known to date have more than 50% difference (see example 6 below). This fact justifies the existence of a new sub-family (unknown until today), here proposed to be the number α -KTx 21; examples α -KTx21.1 and α -KTx21.2. It is an original disclosure and definitively shows that both peptides are structurally different from any other such ligands, including those from sea anemone, bees and snake venoms peptides.

2) The N-terminal segments of both sequences up to amino acid in position 10 are identical and 7 of the 8 positions of cysteines that maintain the disulfide bridges are in identical locations of the primary structure. The eighth cysteine (C8) of Vm23 is located in position 35, at the extreme of the C-terminal side, one amino acid earlier compared to Vm24. For this reason Vm24 has 36 residues, whereas Vm23 has 35 amino acid residues. The last cysteine of Vm23 is not amidated, but we assumed that the structural folding is the same as that of Vm24. Since the physiological effects of both Vm23 and Vm24 are comparable it is expected that the amino acid sequence at the N-terminal region is crucial for activity. When comparing the primary structures of Vm23 and Vm24 five differences were found in positions: 10, 13, 17, 23 and 29, and one indel between the last amino acid and the previous one (Y34 in Vm23 and Y35 in Vm24). The most variable region is at the central part of both peptides (residues 10 to 30, in which five out of six differences are located), suggesting that possibly these residues are not so critical for the function of either of the peptides. It is worth mentioning that the substitutions in positions 17 (R/K), 23 (N/S) and 29 (R/K) are conservative modifications, because both arginine (R) and lysine (K) are charged basic amino acids, whereas asparagines (N) and serine (S) are non-charged hydrophilic amino acid residues. The lack of tyrosine in position 35 (substituted for cysteine in Vm23) compared to Vm24, suggests that just one tyrosine is sufficient for the same folding and function of both peptides.

3) The most variable region is thus located at the central part, allowing for conservative substitutions. This can be easily designed by an expert in the field, and modifications or substitutions by amino acid with similar physicochemical properties in aligned positions that shares at least 83% pairwise sequence identity (as shown here for the case of Vm23 and Vm24) are expected to generate a functional equivalent analog with similar properties, and thus should fall within the scope of the present invention.

4) The most important feature, however, as shown and discussed in examples 7 to 10 below is the high affinity that both Vm23 and Vm24 have towards hKv1.3 channels, when compared to other sub-types of potassium channels. Vm23 and Vm24 have higher affinity towards hKv1.3 than the other known blockers, such as Charybdotoxin, Anuroctoxin, BgK, ShK, etc. [Panyi et al., 2006]. The other blockers mentioned above have highly distinct amino acid sequences and/or disulfide pairings, or display a distinct specificity of action and affinity of binding toward Kv1.3 channels. From the simple analysis of the primary structures of Vm23 and Vm24 it is not obvious that they should affect Kv1.3 channels in similar manners as those shown for the other scorpion or sea anemone toxins. In this way, the sequences for which a proprietary information and use is claimed here for Vm23 and Vm24 could not be evident from the knowledge of the other peptides that affect Kv1.3 channels. This invention reports completely distinct and novel amino acid sequences (see SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3). Further evidence showing that the determined sequence is correct comes from the results obtained with a synthetically prepared Vm24. Both the native Vm24 and the synthetically prepared have exactly the same physiological actions, as shown below (example 9).

5) Finally another important fact found with these two peptides is that they are not toxic when injected into experimental animals at relatively high concentration (up to 10,000 microgram per 20 gram mouse weight). This is more significant when we compare with other known scorpion venom toxins, e.g. Cn2 from *Centruroides noxius*, as mentioned earlier [Zamudio et al., 1992]. Cn2 injected into mice at about 800-fold lower dose than Vm24 causes 50% mortality.

55 Example 2: Mass finger print analysis of the components present in the venom of *V. mexicanus*.

[0100] Scorpion venoms are highly complex mixtures of components, comprising short and long-chain peptides active on ion-channels (reviewed in [Possani and Rodriguez de la Vega, 2006]), free amines, nucleotides, carbohydrates, lipids

EP 2 158 213 B1

(reviewed in Possani et al., 1999), enzymes such as phospholipases [Zamudio et al., 1997; Valdez et al., 2004], hyaluronidases and lysozymes [Batista et al., 2007] and many other protein components of unknown function [Diego-Garcia et al., 2007]. Additionally, scorpions are very ancient creatures with more than three hundred million years of evolution on the surface of the Earth and have had time to select specific tools for hunting their preys or for defending themselves from predators. For these reasons it is appealing and wise to search for the presence of biologically active components in their venoms. Thanks to the recent when compared to other sub-types of potassium channels. Vm23 and Vm24 have higher affinity towards hKv1.3 than the other known blockers, such as Charybdotoxin, Anuroctoxin, BgK, ShK, etc. [Panyi et al., 2006]. The other blockers mentioned above have highly distinct amino acid sequences and/or disulfide pairings, or display a distinct specificity of action and affinity of binding toward Kv1.3 channels. From the simple analysis of the primary structures of Vm23 and Vm24 it is not obvious that they should affect Kv1.3 channels in similar manners as those shown for the other scorpion or sea anemone toxins. In this way, the sequences for which a proprietary information and use is claimed here for Vm23 and Vm24 could not be evident from the knowledge of the other peptides that affect Kv1.3 channels. This invention reports completely distinct and novel amino acid sequences (see SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO:2). Further evidence showing that the determined sequence is correct comes from the results obtained with a synthetically prepared Vm24. Both the native Vm24 and the synthetically prepared have exactly the same physiological actions, as shown below (example 9).

5) Finally another important fact found with these two peptides is that they are not toxic when injected into experimental animals at relatively high concentration (up to 10,000 microgram per 20 gram mouse weight). This is more significant when we compare with other known scorpion venom toxins, e.g. Cn2 from *Centruroides noxius*, as mentioned earlier [Zamudio et al., 1992]. Cn2 injected into mice at about 800-fold lower dose than Vm24 causes 50% mortality.

Example 2: Mass finger print analysis of the components present in the venom of *V. mexicanus*.

[0101] Scorpion venoms are highly complex mixtures of components, comprising short and long-chain peptides active on ion-channels (reviewed in [Possani and Rodriguez de la Vega, 2006]), free amines, nucleotides, carbohydrates, lipids (reviewed in Possani et al., 1999), enzymes such as phospholipases [Zamudio et al., 1997; Valdez et al., 2004], hyaluronidases and lysozymes [Batista et al., 2007] and many other protein components of unknown function [Diego-Garcia et al., 2007]. Additionally, scorpions are very ancient creatures with more than three hundred million years of evolution on the surface of the Earth and have had time to select specific tools for hunting their preys or for defending themselves from predators. For these reasons it is appealing and wise to search for the presence of biologically active components in their venoms. Thanks to the recent advancement on mass spectrometry methodologies and equipments it is now possible to obtain a mass finger print analysis of the whole venom. For these reasons one of the first studies conducted with the soluble venom of *V. mexicanus* was the identification of the molecular masses of all components, that could be identified by using a Finnigan LCQ^{DUO} (San Jose, CA) ion trap mass spectrometer (EIS/MS) and a matrix-assisted laser desorption time of flight (MALDI-TOF), model Ettan MALDI-TOF/Pro apparatus from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). The strategy used was to pre-select by HPLC separation pure peptides or families of related components eluting as mixtures in the C 18 reverse column (Fig. 1) and then analyze their molecular mass by mass spectrometry. In Table 1, the retention time of the fractions collected from the HPLC system is listed followed by the molecular masses of components found in each fraction. Over 340 distinct molecular mass components were determined. It is worth mentioning that some components appear in two contiguous sub-fractions of the HPLC separation system, and in such cases only one was counted. Also some fractions were not identified (labeled ND).

TABLE 1:

RT	Average mass	RT	Average mass
2.92	222.334, 260.168, 372.815	27.12	1340.203, 1642.177, 2620.029
5.06	272.055	28.24	2084.938, 2883.506, 3770.697
B 5.06	429.1	28.72	222.295, 373.089, 4037.264, 4062.469, 4860.475
7.40	- ND	29.12	2028.249, 4044.625, 4743.102
9.84	1235.349	S 29.82	1989.272, 2117.962, 3770.356, 3828.061, 4048.342, 5125.488
10.78	994.899, 1047.829, 1234.056	29.82	2368.289, 2514.764, 3772.141, 4131.437, 4196.231, 5612.061, 5684.0
11.28	117.063, 1234.349	30.62	1219.7, 2029.978, 2756.56, 4051.043, 5487.234

EP 2 158 213 B1

(continued)

RT	Average mass	RT	Average mass
B11.28 -	ND	31.20	1894.409, 2288.761, 3544, 3695.567, 3873, 4053.615, 4623.314, 5309.113, 5468.43, 8340.499
13.07	300.703	31.71	2526.804, 4053.34, 4256.777, 4623.389, 8184.727
14	1466.168, 1960.937, 2363.969, 2441.293, 3091.036	32.22	2610.12, 3068.716, 4050.544, 4251.603, 4616.633, 8157.368
14.96	- ND	32.78	1727.988, 3115.418, 3838.78, 6231.008
15	272.091, 334.602, 427.197, 1086.902, 1689.2	33.47	1288.661, 1630.123, 1856.102, 2076.866, 2116.85, 2306.616, 3302.189, 4160.467, 4322.925, 5434.357, 6514.206, 7937.084, 8364.316, 9125.702, 15373.608
16.22	- ND	34.11	1811.589, 2792.828, 2890.806, 3272.21, 4008.728, 4044.677
16.70	324.238, 418.72, 501.4, 834.6, 1049.296, 1877.397	S135.79	3032.485, 3862.668, 7469.49
17.34	261.344, 1205.752, 1274.737, 1876.767, 1886.725	S2 35.72	2558.149, 3032.024, 3987.629, 4232.375, 8260.244
17.66	261.283, 1243.892	S3 35.79	3037.876, 3058.507, 3738.686, 4027.624
18.35	208.909, 223.509, 373.827, 1436.27, 1652.505	35.79	3038.075, 3738.649, 4027.696, 8269.386
19.10	1148.738, 2096.296, 2297.193, 2318.577, 2353.524	36.19	2814.497, 3038.868, 3564.677, 3721.56, 3807.978, 3878.666, 4027.936, 8267.094, 13944.696
B 19.10	2377.208, 2593.419, 2610.334	36.72	3588.529, 3610.297, 3625.895, 3983.521, 4020.726, 4223.762
20.14.	2593.88	46.53	3915.145, 4051.546, 4319.845, 4710.326, 4782.406, 4868.122, 5107.706, 7067.905, 13435.689
20.14.2	1464.42, 2098.654, 2594.163, 2610.477	46.86	3920.472, 4236.709, 5044.021, 5182.747, 8246.293, 11459.022, 13358.3, 16209.23
20.23	- ND	47.82	4298.5, 4700.818, 5272.777, 12469.982
20.96	1866.081, 3777.92	48.70	2166.644, 2304.621, 2569.271, 2768.228, 3278.62, 3424.448, 3819.497, 3916.217, 4265.672, 4292.422
21.98	431.4, 714.7, 1259.696, 3777.049	49	5953.928, 11315.991
22.40	533.5, 788.5, 2286.744, 4024.456, 4980.605	49.6	- ND
23.39	1014.47, 1129.8, 1390.042, 1527.099, 1902.299, 2111.018, 2228.143, 2311.791, 3665, 4025.1	50.75	-ND
S24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809	51.66	- ND
S 24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809	52.34	- ND
24.11	1952.328, 2166.86, 3864, 5338.229	53.31	3460.978, 3807.741, 5673.486, 10978.726, 16185.602, 24611.234
B 24.11	253.04, 875.42, 1398.661, 1948.124, 2436.139, 2679.346, 5336.308	53.84	3548.378, 3591.69, 3899.344
25.10	1489.6, 1511.315, 1617.7, 2529.512, 3864.577	54.27	-ND
25.10.2	253.073, 590.4, 1194.739, 1511.312, 1985.92, 2075.691	55.20	- ND
25.52	1485.399, 1728.229, 2258.489, 2387.001	56.27	1603.661, 1640.656

EP 2 158 213 B1

(continued)

RT	Average mass	RT	Average mass
26.10	422.3, 462.4, 1327.008, 1495.436,	58.92	-ND
	2258.772, 2620.03 , 3870.226, 3917.489		
26.51	1234.369, 2621.099 , 3871.574		

Components labeled with bold figures mean that they were present in higher concentration in the venom, whereas those in italic figures mean the component was identified only on the EIS/MS spectrometer. When the time of retention is preceded by the letter S means that the chromatographic peak was not symmetrical, and the fraction collected corresponds to the ascending segment of the curve, whereas if the letter is B it means the descending segment of the curve. Italic figures mean that the corresponding molecular mass was obtained only by EIS/MS. Some values were not determined (ND).

[0102] The various components registered in Table 1 were analyzed and arbitrarily grouped according to molecular weight in increments of one thousand, starting with those that had less than 500 Da, then from 500-1000, 1000-2000 and so forth up to 9000-10000 Da (by 1000 difference each group). More than 90% of the components identified have molecular masses under 10,000 Da of molecular weight. Three groups had at least 60 different components. They fall within the range of 1000-2000; 2000-3000 and 3000 to 4000 Da. More than 40 components had from 4000 to 5000 Da molecular masses.

[0103] These results were important for choosing the appropriate peptides for functional analysis. The rationale used is discussed and published in a recent paper by our group using *Tityus stigmurus* scorpion [Batista et al., 2007], in which a comparative analysis was conducted taken into consideration various mass finger print analyses of different species of scorpions (not included *V. mexicanus*). It is common to find that peptides with molecular weights in the order of 4,000 Da are specific for the recognition of ion-channels permeable to K⁺ ions. For this reason we have selected peptides in this range of molecular masses for the physiological studies, described below. By following this strategy the two peptides: Vm23 and Vm24 were selected for primary structure determination (Fig.2) and further physiological assays (see below, examples 7-10).

Example 3: Characterization of the C-terminal amino acid sequence of Vm23 and Vm24

[0104] Concerning the last residue at the C-terminal amino acid sequence of Vm23 the results are clear. The sequence analysis described in example 1 of this disclosure, whose sequence is shown in figure 2, leaves little doubt that the last residue is not amidated and terminates the primary structure with a free carboxyl cysteine residue.

[0105] However, for Vm24 the mass spectrometry results suggest that the C-terminal residue could be amidated. The literature reports examples where the amidation of the last amino acid of a given peptide is important for defining its biological function. One such example is the case found for toxin HsTx1 of the scorpion *Heterometrus spinifer* [Lebrun et al., 1997]. Electrophysiological experiments have demonstrated that the amidated form of this toxin is 5-fold more potent than the free-carboxyl-terminal form and it is up to 300-fold more active in binding experiments to rat brain synaptosomes [Lebrun et al., 1997]. For this reason it was very important to be sure of the chemical form of the last residue of Vm24. As mentioned in the discussion of example 1, the experimental molecular mass found for Vm24 was 3864 Da, and the theoretical molecular weight expected from the amino acid sequence shown in Fig.2 was 3864.6 Da. The two values are different by 0.6 a.m.u which could be attributed to the presence of an amidated C-terminal residue of Vm24. Collision induced dissociation (CID) experiments performed with the C-terminal peptide (909.4 a.m.u.-monoisotopic mass) produced by Arg-C cleavage show all y ion series values 1.0 a.m.u. lower than those theoretically expected for a free carboxy-terminal peptide and exact values for the b ion series, confirming that the C-terminal of the toxin is amidated (Fig. 3).

[0106] For this experiment an aliquot of 25 micrograms protein of Vm24 was enzymatically cleaved with the enzyme Arg-C, using the same procedure described in example 1 above [Valdez et al., 2004; Batista et al., 2007]. The product of enzymatic hydrolysis was separated by HPLC in the same system as described in Fig.1. All peptides in homogeneous form were systematically analyzed by MS and the peptide with molecular mass of 909.5 a.m.u. was submitted to MS/MS analysis. The experimental protocol set for the nano spray ionization source of the mass spectrometer was 130°C for the heating capillary and 1.65 kV as spray voltage. Surveyor solvent delivery system was operated with 0.6 microliter/min using 50% acetonitrile (AcCN) in the linear mode. The MS/MS scans were defined with 200 scans/milliseconds of injection time, wideband activated, 25 V collision energy, 1.0 (m/z) isolation width and 40% normalized collision energy. The data were analyzed manually and automatically using MS-product tool of the Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) developed by the University of California - San Francisco Mass Spectrometry Facility. The MS-product tool allowed the estimation of the possible ion fragments produced for the peptide KCKCYC using monoisotopic mass, unmodified

EP 2 158 213 B1

cysteines, and unblocked N-terminal residue. The calculation was performed for both the free carboxylic acid terminal and the amidated C-terminal peptide. An ESI Ion Trap instrument was chosen for this evaluation. The theoretical fragmentation of the amidated C-terminal peptide was performed using the Protein Prospector, which showed the exact same values for those obtained experimentally for b (232.11, 360.21, 463.22, 626.28 and 789.34) and for the y ions (782.27, 679.26, 551.16, 448.15, 285.09 and 122.03). Therefore, the Vm24 peptide possesses the C-terminal amidated, that is, a cysteinamide residue.

Example 4: Determination of the disulfide bridges of Vm24

[0107] Due to its small size Vm24 toxin is an ideal molecule for studying structure-function relationships. The peptide contains eight cysteine residues, located at positions 6,12,16,21,26,31,33 and 36, which form four intramolecular disulfide bonds. This example describes the determination of the disulfide bonding pattern of Vm24 using Edman degradation and mass spectrometry determination of peptides purified by RP-HPLC columns, after cleavage with proteolytic enzymes.

[0108] The disulfide pairing was determined by mass spectrometry analysis of peptide fragments obtained after endopeptidase cleavage of pure toxin and their separation by HPLC. A sample of toxin containing 25 micrograms of protein was incubated with an equal mixture (0.5 microgram each) of chymotrypsin and trypsin (Boehringer Mannheim, Germany) in 150 mM Tris-HCl, pH 6.8, for 12 h at 37°C. The peptides generated were separated by HPLC using a C18 reverse phase column (catalog number 218TP54, from Vydac, Hesperia, CA). A linear gradient from solvent A (0.12% TFA in water) to 60% solvent B (0.10% TFA in acetonitrile) was applied to the column and run for 60 minutes. The effluent peaks were collected and immediately freeze-dried. Individual peptides were analyzed by mass spectrometry fragmentation (MS/MS) from which the amino acid sequence was obtained. Since the primary structure was known, the assignment of the disulfide bridges could be inferred.

[0109] Molecular mass comparison of reduced and oxidized forms of Vm24 show exactly 8 a.m.u. difference; the experimental molecular mass found for the native peptide was 3864.0 a.m.u. and for the completed reduced peptide was 3872 a.m.u., confirming that all cysteines are involved in disulfide bridge formation. Three main peptide fragments were obtained from simultaneous chymotrypsin and trypsin digestion at pH 6.8 (slightly acidic pH in order to prevent mix disulfide rearrangements), showing monoisotopic molecular masses of [M+H]⁺ 788.0, [M+H]⁺ 560.4 and [M+2H]²⁺ 1099.7 a.m.u. (Figs. 4-1, 4-2 and 5A). The peptide with [M+H]⁺ 788.0 corresponds exactly to the expected molecular weight of the cystine-pairs (C4-C8), of the heterodimer amino acid sequence AQGCK-CY (Fig 4-1). The second disulfide bridge determined was C3-C6 that has equal theoretical and experimental values of 560.4 a.m.u. (Fig 4-2). Both peptides were further characterized by CID experiments showing the expected amino acid sequences. The signal at m/z [M+2H]²⁺ 1099.7 a.m.u. (2197.4 deconvoluted mass) comes from the heterodimer core containing the last two cystine half-pairs (Fig. 5A). This fragment was directly analyzed. The CID ions series from the signal at m/z [M+2H]²⁺ 1099.7 shows two ion values that satisfy the condition for the complete determination of the last two cystine pairs. The b ion at 1507.4 and the y-ion at 691.3 that are products from the same amide cleavage bond between the glutamic acid (E11) and Cysteine (C12) clearly assign the C1-C5 and C2-C7 half-pairs. Furthermore, the *in tandem* fragmentation values from the b-ion 1710.5 to b-ion 1137.3 characterize the internal tag (GSPEC-C) with unequivocal mass values confirming the disulfide bridge arrangement schematically represented in the Fig.5B).

Example 5: Chemical synthesis of Vm24

[0110] In this example and before describing the chemical synthesis of Vm24 it is important to cover some basic concepts in the subject of peptide chemistry and the rationale for the production of ligands by chemical synthesis, rather than by natural extraction of the existing products.

[0111] Many toxic polypeptides have been purified from venom sources and were shown to be valuable tools to study cellular communication, because they affect the ion distribution across the biological membrane by binding to receptors (mostly ion-channels for the case of scorpion toxins) and they cause cell depolarization or modulation of the electrical potentials across the membranes, in this way controlling cellular function. For these reasons, finding specific toxic peptides that can discriminate distinct types or sub-types of ion-channels are valuable therapeutic leads in the treatment of a range of physiological or abnormal conditions of experimental animals, and eventually for treatment of human pathologies. Most of the known peptides are short, well folded and packed structures presenting a series of advantages over other organic compounds, such as high potency, good target specificity, high solubility and rapid onset of action. Furthermore they are often small proteins cross-linked by several disulfide bridges. These structural characteristics confer to these peptides a high degree of stability, although the correct folding of a synthetically prepared derivative poses some additional problems for proper synthesis. However, the amounts of these polypeptides present in venom sources usually are quite small. Actually, since they are so specific and efficient in their physiological actions, the animal that produces these peptides does not need to produce great quantities in order to use them in an effective manner, either for capturing their preys or defending themselves from predators. Although the amounts of these various peptides

EP 2 158 213 B1

EP 2 158 213 B1

directly isolated from the sources usually are enough to characterize the general mechanism of action and have allowed, in the past, the conduction of structural characterization of the peptide, mainly by nuclear magnetic resonance techniques, usually it is necessary to produce the same peptide or their derivatives synthetically, depending on the scope pursued by the investigation or clinical applications. The determination of the three-dimensional structure of the peptides and the identification of the surface implicated in the recognition of the receptor sides (ion-channels) are fundamental for the design of modified versions of the initial model or for the synthesis of peptidomimetics.

[0112] Here we describe the chemical synthesis of Vm24. Historically Vm24 was identified earlier than Vm23. For this reason most of the detailed work, subject of this invention, was done and described here for the case of Vm24, and then was confirmed to be true for both peptides.

[0113] A linear analog of Vm24 was synthesized by solid-phase methodology on Rink Amide MBHA resin, (Calbiochem-Novabiochem Corp). Fmoc-amino acids (Calbiochem-Novabiochem Corp) were used with the following side chain protection Arg(Pbf), Asn(Trt), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), Lys(Boc), Ser(tBu), and Tyr(tBu).

[0114] The Fmoc group was removed by treatment with 20 % piperidine in dimethylformamide (DMF) for 20 min followed by wash with DMF. Fmoc- amino acids (0.5 mmol) were coupled as active esters preformed in DMF with HBTU (2-(1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate)/DIEA (diisopropylethylamine) (0.45mmol/0.75mmol, 2 min activation) as activating agents. Coupling times were 30 min. Unreacted or deblocked free amines were monitored through the ninhydrin test, (Sarin et al 1981) in every cycle of the peptide synthesis. During the entire synthesis, before coupling the next amino acid, the undesirable residual free amines were blocked by acetylation. All the operations were performed manually in a 50 ml glass reaction vessel with a Teflon-lined screw cap. The peptide-resin was agitated by gentle inversion during the α -deprotection and coupling steps.

[0115] Following final removal of the Fmoc-group, the peptide resin (1.7 grams) was cleaved from the resin and simultaneously deprotected using reagent K [Drakopoulou et al 1995] for two hours at room temperature. Following cleavage, the crude peptide was precipitated and washed with ice-cold t-butyl ether, then dissolved in 20% aqueous acetic acid. The product was lyophilized and kept desiccated at -20 °C until used.

[0116] The cyclization reaction to make the corresponding disulfide bridges of the molecule was carried out in 0.1 M NaCl, 5 mM reduced glutathione, 0.5 mM oxidized glutathione, 20 mM Na_2HPO_4 (pH 7.8) and 30 μM of unfolded synthetic Vm24. The crude cyclized product was purified in two steps by HPLC. The first used a C_{18} preparative column (238TP1022 Vydac), with a linear gradient of solution A (0.12% TFA in water) to solution B (0.1% TFA in acetonitrile) run up to 60% B in 60 min. The profile of the chromatogram obtained is shown in Fig.6. The main component (labeled number 1 in the figure 6, was finally purified using a C_{18} analytical column (218TP54 Vydac) run with linear gradient from solvent A to 40% B in 60 min. (inset of Fig 6) The structure and the purity of the synthetic toxin were confirmed by analytical HPLC, amino acid sequence and mass spectrometry determination. Amino acid sequence was carried out in a Beckman LF3000 Protein Sequencer (Fullerton, CA) and mass spectrometry analysis was done in a FinniganLCQ^{Duo} spectrometer (San Jose, CA, USA). The correctness of the amino acid sequence was verified by direct Edman degradation up to residue number 30. The elution time from the HPLC column coincided exactly with the time where the native peptide elutes from the same column in identical conditions. Examples of the elution pattern obtained with native Vm24 (Fig.7A), synthetic Vm24 as described here (Fig. 7B) and an equimolar mixture of native and synthetic Vm24 (Fig 7c) are shown in figure 7. The molecular mass determined by mass spectrometry was 3864 Da, showing that it corresponds exactly to that of the expected sequence. It is worth noting that the resin used is designed for the production of a C-terminal amidated peptide, exactly as it is the case for Vm24.

[0117] From about 1.7 grams of resin containing the synthetically prepared peptide with the expected primary sequence of Vm24, about 300 milligrams of corrected folded peptide was obtained, representing a yield of 30% of theoretical expected value (from the starting resin)

Example 6: Amino acid sequence comparison

[0118] The sequences of SEQ NO: 1 and SEQ NO: 2 show some resemblance with other short chain scorpion toxins classified within the α -KTx family [Tytgat et al., 1999], such as short peptide chain, rich in basic amino acid residues and similar cysteine pattern. All the members of this family are structurally related and perform similar functions as potassium channel blockers; nonetheless, they display variable selectivity for certain types and subtypes of potassium channels [Rodríguez de la Vega and Possani, 2004; Panyi et al., 2006]. The rationale followed by the international panel of experts which proposed the classification was that a given subfamily could be identified by a high percentage of similarity amongst its members and a low identity with members of other subfamilies [Tytgat et al., 1999]. Later, it was demonstrated that this distinction mirrored, to some extent, the pharmacological spectrum of most subfamilies (Rodríguez de la Vega et al., 2003; Zhu et al., 2004). Hence, taken into consideration the relatively restricted variability of the family -due to its reduced size-, it is important to identify the molecular and structural characteristics that confers a given functional spectrum. This kind of analysis is usually performed by sequence comparison and phylogenetic inference. The idea underlying these comparisons relies on the assumption that those proteins belonging to the same lineage

should be related by events of speciation followed or concomitant to duplication and divergence of the ancestral gene (s), making possible the reconstruction of their evolutionary history by bioinformatic analyses and helping to deparate the fitness landscape within a given sequence space [Thornton and DeSalle, 2000; Orengo and Thornton, 2005].

[0119] Using programs that perform heuristic searches within local alignments (BLAST [Altschul et al., 1990] and FASTA 3 [Pearson and Lipman, 1988]) for the identification of sequence similarities of Vm24 and Vm23, few relatives were identified with quite low expectance values (E-value >10⁻⁵). Closer inspection against all short chain toxins reported to date suggests that Vm24 and Vm23 are possibly novel members of α -KTx subfamily 6 (following the proposal of [Tytgat et al., 1999]). Pairwise comparison, however, reveals. low identity with other members of the subfamily (Figure 8). The extensive sequence diversification of the α -KTx family makes very difficult to resolve whether or not Vm24 and Vm23 belong to any of the 20 previously characterized α -KTx subfamilies. In order to clarify the relationship with the α -KTx family, Bayesian phylogenetic inference analysis was performed as described previously [Bagdany et al., 2005] with MrBayes 3.04b [Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003], using the multiple sequence alignment of 92 sequences belonging to the α -KTx family. Bayesian phylogenetic inference estimates the posterior probability of a given tree topology by a Markov chain Monte Carlo (MCMC)-based sampling procedure over *n*-1 stochastically generated trees. One Markov chain remains heuristically searching within the tree topology with best posterior probability at a given step of the sampling procedure; evaluated under a specified amino acid substitution model (the overall process is called Metropolis coupling Markov chain Monte Carlo or MC³). For this analysis, four chains with 250,000 trees each were generated under the JTT amino acid substitution model and sampled every 250th iterations. Coalescence was obtained approximately at 175,000 iteration and the remaining 250 trees with best posterior probabilities were merged to calculate a 50% majority rule consensus tree. This tree clearly shows that α -KTx subfamily 6 segregates, in 92% of the final tree set, as a monophyletic group including all of its members and two closely related toxins from subfamily 7. The analysis also places Vm24 and Vm23 as a sister group of this clade (the specific partition prevail in 81% of the final trees, see Figure 8); which strongly supports that Vm24 and Vm23 constitute a novel α -KTx subfamily. Based on these analyses and taking into considerations the guidelines proposed by the international panel of experts that classified the scorpion toxins specific for K channels [Tytgat et al., 1999] it is certain that Vm23 and Vm24 constitute a novel sub-family of scorpion toxin that recognize K channels. The highest sequence identity between these toxins is located at the C-terminal portion, like other K channel blocker sub-families. The N-terminal segment is the most variable region of this sub-family and only Vm24 and Vm23 present an uncommon continuous triple Alanine segment at the beginning of the sequence.

Example 7: Vm24 blocks selectively the voltage gated hKv1.3 channel over the Ca²⁺ activated K channel hKCa1 of T cells

High affinity block of hKv1.3 channels by Vm24

[0120] The block of hKv1.3 channels by Vm24 was characterized in channels expressed endogenously in human peripheral blood T cells [Peter et al., 2001; Bagdany et al., 2005]. The brief description of the procedure for obtaining T cells for electrophysiological experiments is as follows. Heparinized human peripheral venous blood was obtained from healthy volunteers. Mononuclear cells were separated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Collected cells were washed twice with Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hank's solution containing 25 mM HEPES buffer (pH 7.4). Cells were cultured in a 5% CO₂ incubator at 37 °C in 24 well culture plates in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS/Hyclone, Logan, Utah, USA), 100 microgram/ml penicillin, 100 microgram/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at 0.5 x 10⁶/ml density for 3-4 days. The culture medium also contained 6 or 8 microgram/ml of phytohemagglutinin A (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) to increase K channel expression [Deutsch et al., 1986]. T lymphocytes were selected for current recording by incubation with mouse anti-human CD2 (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) followed by selective adhesion to Petri dishes coated with goat anti-mouse IgG antibodies (Biosource, Camarilo, CA, USA), as described by Matteson and Deutsch (Matteson et al., 1984). Dishes were washed gently five times with 1 ml of normal extracellular bath medium (see below) for the patch-clamp experiments.

[0121] Whole-cell currents were measured in voltage-clamped T cells using an Axopatch 200A or Multiclamp 700B amplifiers connected to personal computers using Axon Digidata 1200 or Digidata 1322A data acquisition hardware. Series resistance compensation up to 85% was used to minimize voltage errors and achieve good voltage-clamp conditions. For data acquisition and analysis the pClamp8 or pClamp9 software package (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA) was used. Prior to analysis whole-cell current traces were corrected for ohmic leak and digitally filtered (3 point boxcar smoothing). Determination of the peak currents at high degree of current block was done by fitting a rising fourth power exponential function to the data traces [Hodgkin-Huxley model] with time constants fixed to the ones determined in the absence of the toxin to isolate the amplitude of the rising component.

[0122] Pipettes were pulled from Clark GC 150 F-15 borosilicate glass capillaries in five stages and fire polished resulting in electrodes having 2-3 mega Ohms resistance in the bath. The bath solution consisted of (in mM): 145 NaCl,

EP 2 158 213 B1

5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5.5 glucose, 10 HEPES (pH 7.35) supplemented with 0.1 mg/ml bovine serum albumin (Sigma). The measured osmolarity of the external solution was between 302 and 308 milliosmols (mOsm). The pipette-filling solution (internal solution) consisted of (mM): 140 KF, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA (pH 7.22). The measured osmolarity of the internal solutions was approximately 295 mOsm. Bath perfusion around the measured cell with different test solutions was achieved using a gravity-flow perfusion setup with 6 input lines and PE10 polyethylene tube output tip with flanged aperture to reduce the turbulence of the flow. Excess fluid was removed continuously.

5 **[0123]** The standard voltage protocol to evoke voltage K⁺ currents in T cells consisted of a series of 14-ms-long depolarizations to +50 mV from a holding potential of -120 mV. The time between voltage pulses was set to 15 s in order to avoid cumulative inactivation of hKv1.3 channels. Representative current traces in normal bath solution are shown in Fig. 9A (control). Under the experimental conditions applied (the lack of Ca²⁺ in the pipette-filling solution and the nature of the voltage protocol) the whole-cell currents were conducted exclusively by hKv1.3 channels [Peter et al., 2001]. Fig. 9A displays macroscopic K⁺ currents through hKv1.3 channels recorded sequentially in the same cell, before (control traces) and following the addition of 1 nM Vm24 to the external solution by perfusion. The Kv1.3 current completely disappeared by the 12th pulse (corresponding to 3 min) in the presence of 1 nM Vm24.

10 **[0124]** The kinetics of the development of the block at 1 nM (filled circles) and 0.3 nM (empty circles) Vm24 concentrations are shown in Fig. 9B. Following the 4th pulse in control solution the extracellular perfusion was switched to a toxin-containing solution and the depolarizing pulses continued every 15 s. Peak currents were determined and normalized to the peak current in control solution and plotted as a function of time. The figure shows that at higher toxin concentration, the kinetics of the development of the block is faster as expected from a pseudo-first order reaction between the toxin and the channels, however, at both toxin concentrations a full block of the whole-cell Kv1.3 current is achieved. Data for 1 nM Vm24 concentration are from the experiment shown in Fig 9A. Perfusing the recording chamber with toxin-free control solution resulted in a very small relief of the block within the first 8 minutes (not shown). During a 10.5-minute-period of the application of the toxin at 3 pM concentration (Fig. 9C) the loss of the current seems to saturate at ~36% of the peak recorded in control solution. This period was followed by a 30 minute washout period (arrow indicates the start of the perfusion with toxin-free solution) during which one third of the blocked current recovers with an extremely slow kinetics (estimated time constant for washout is ~3800 s corresponding to an off rate of ~2.6 × 10⁻⁴ s⁻¹).

15 **[0125]** The general mechanism by which scorpion toxins block K channels is the plugging of the ion conduction pathway upon their binding to the extracellular vestibule of the channel [Goldstein and Miller, 1993]. The slow and incomplete reversibility of the reduction of the currents in the presence of Vm24, however, might indicate a non-specific effect of the peptide on the membrane rather than block of hKv1.3. We argue against this scenario as follows: 1) the rate for the development of the current loss (at high toxin concentrations) depended on the concentration of Vm24, being faster at higher toxin concentrations (Fig. 9B); 2) the leak current did not increase in the presence of the toxin, indicating the lack of the general damage of the membrane by Vm2; 3) Vm24 did not inhibit several other K⁺ currents or inhibited them quickly and reversibly (see later in the selectivity profile of the toxin) which argues very strongly against a non-specific action of the toxin on the structure of the plasma membrane or a toxin-induced loss of the function of membrane proteins in general; 4) simultaneous application of ChTx, a well-known pore blocker of Kv1.3, and Vm24 showed competition between the two toxins for the same binding site that was evident from the slowing of Vm24 blocking kinetics with increasing concentrations of ChTx (data not shown).

20 **[0126]** The very slow on and off rates of the toxin imposed limitations on the generation of the dose-response relationship are presented in panel D of Fig. 9. In general, for equilibrium block of the channels at different peptide concentrations the remaining current fraction (RCF) is calculated as I/I_0 where I and I_0 are the peak currents recorded in the presence and absence of the toxin, respectively. Due to the very slow on rate at low peptide concentrations the determination of I was problematic since the drop in the peak current from episode-to-episode was so small that an apparent saturation was observed during data collection, although the block might not have reached its equilibrium value yet. The use of longer toxin applications was limited by the stability of the peak currents in a whole-cell patch clamp record. Furthermore, rundown of the peaks could not be determined independently due to the extremely long wash-out time of the peptide. Thus, data presented in Fig. 9D represent upper limits for I/I_0 values at different toxin concentrations, therefore, the K_d estimated from the dose-response relationship is also an overestimate of the real K_d . The dose-response relationship in Fig 9D was fit with the RCF = $K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$ function, where $[Tx]$ indicates the toxin concentration, K_d is the dissociation constant, and n is the Hill coefficient. The superimposed solid line shows the best fit with parameters K_d = 2.9 pM and a Hill coefficient ~1. Error bars indicate SEM ($n = 3-6$). The $n \sim 1$ value for the Hill coefficient indicates that a single toxin molecule interacts with the channel (1:1 stoichiometry). To the best of our knowledge Vm24 has the highest affinity as a blocker of hKv1.3 in electrophysiological assays.

25 *Vm24 is a low affinity blocker of hKCa1 channels*

[0127] As outlined in the introduction to example 7 one of the most important requirements for a peptide to be a

EP 2 158 213 B1

selective immunosuppressant is its selectivity for Kv1.3 over IKCa1. IKCa1 channels are also expressed endogenously in T cells [Grissmer et al., 1993]. The current carried by IKCa1 channels can be measured using a pipette filling solution having 1 μM free Ca²⁺ concentration, which is sufficient to fully activate these channels [Grissmer et al., 1993]. However, the simultaneous presence of Kv1.3 channels in the same cells makes the pharmacological characterization of IKCa1 channels difficult and restricts the study to membrane potentials where Kv1.3 channels are not activated [Grissmer et al., 1993; Bagdany et al., 2005]. This and the relatively small number of IKCa1 channels even in stimulated T cells motivated us to study IKCa1 pharmacology using recombinant channels.

5 **[0128]** The EGFP-tagged human IKCa1 gene (AF033021) was transfected into Cos-7 cells using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The EGFP-tagged hIKCa1 clone was shown previously to have identical biophysical and pharmacological properties to the native IKCa1 in T cells, and thus, has been used widely in pharmacological studies [Wulff et al., 2001]. Cos-7 cells were maintained in standard cell culturing conditions [Bagdany et al., 2005]. Currents were recorded 2-3 days after transfection. GFP positive transfectants were identified in a Nikon TE2000U fluorescence microscope and used for current recordings. The normal extracellular solution is the same as described above. The composition of the pipette filling solution was (in mM) 150 K-aspartate, 5 HEPES, 10 EGTA, 8.7 CaCl₂, 2 MgCl₂, (pH 7.2). This solution contained 1 μM free Ca²⁺ concentration to fully activate the hIKCa1 current. All other recording conditions (data acquisition, perfusion etc.) were identical to the description above for Kv1.3 channels.

10 **[0129]** Two hundred millisecond-long voltage ramps from -120 mV to +50 mV from a holding potential of -120 mV were used to elicit hIKCa1 currents in Cos-7 cells (ramp speed 0.85 mV/ms). Voltage ramps were run every 10 s. The current trace recorded in the absence of Vm24 (control) in Figure 9E shows that pure, non-voltage-gated hIKCa1 currents were evoked by the applied voltage protocol. The reversal potential of the current is -75 mV, which is characteristic to a K⁺ conductance based on the ionic composition of the recording solutions. For IKCa1 currents the slope (s) of the linear current-voltage relationship can be used to characterize the current block [Grissmer et al., 1993]. The value of s is reduced to ~52% of the control in the presence of 10 nM Vm24 during the experiments shown in Fig. 9E, the equilibrium block is reached in 4.5 min (27 episodes). The current block fully reversed in 2.5 min upon switching the perfusion to toxin-free extracellular solution (Fig.9 E, wash). The remaining current fractions at 1 nM and 10 nM Vm24 concentrations were calculated as s/s_0 where s and s₀ are the slopes of the I-V relationships evoked by voltage ramps in the presence and absence of Vm24, respectively, and presented in Fig 9F. Error bars indicate SEM for n=3 independent experiments. At 1 nM concentration Vm24 practically does not block hIKCa1 channels (Fig. 9F) whereas at the same concentration the peptide blocks hKv1.3 channels completely (Fig. 9D). The K_d of Vm24 for hIKCa1 can be estimated from a model where 1 toxin molecule interacts with 1 channel to give a K_d of ~14 nM. Considering the K_d determined for hKv1.3 (2.9 pM) the selectivity of Vm24 for hKv1.3 over hIKCa1 is at least ~4500-fold.

Example 8: Selectivity profile of Vm24

15 **[0130]** All channel constructs used in this study are routinely used in pharmacological and biophysical assays and their applicability is confirmed in the listed references.

Transient transfections: Cos-7 cells were used to express rat Kv2.1 (rKv2.1, kind gift from Dr. S. Korn, U. of Connecticut) [Immke et al., 1999]; human Kv1.2 (hKv1.2, pcDNA3/Hygro vector containing the full coding sequence for Kv1.2, kind gift from Dr. S. Grissmer, U. of Ulm, Germany) [Visan et al., 2004]; human Kv1.4 (hKv1.4ΔN: the inactivation ball deletion mutant of Kv1.4, a kind gift from D. Fedida, University of British Columbia, Vancouver, Canada) [Kurata et al., 2004]; and human Na_v1.5 (a kind gift from R. Horn, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) [O'Leary et al., 1995; Ahern et al., 2005] channels. tsA-201 cells were used to express hBK channels (hSlo1 gene (U11058), in pCI-neo plasmid, gift from Toshinori Hoshi, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) [Avdonin et al., 2003]. All these channel clones were transiently co-transfected with a plasmid encoding the green fluorescence protein (GFP) at molar ratios of 1:5 using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and cultured under standard conditions. Currents were recorded 2-3 days after transfection. GFP positive transfectants were identified in a Nikon TE2000U fluorescence microscope and used for current recordings (>70% success rate for co-transfection).

20 **Stable cell lines:** L929 cells stably expressing mKv1.1 and MEL cells stably expressing hKv1.5 channels have been described earlier [Grissmer et al., 1994] and were kind gifts of Dr. Heike Wulff (UC Davis, CA, USA). hERG channels were expressed in a stable manner in a HEK-293 cell line.

25 **[0131]** Whole cell currents were recorded as described in example 7. In all cases standard extracellular and pipette filling solutions were used (see example 7) except for recording hBK currents where the composition of the pipette filling solution was (in mM) 140 KCl, 10 EGTA, 9.69 CaCl₂, 5 HEPES (pH 7.2). The free Ca²⁺ concentration of this latter solution is $[Ca^{2+}]_{int} = 5$ micromolar, which allows the recording of BK currents at moderate depolarizing potentials [Avdonin et al., 2003]. All other experimental conditions (data acquisition, principles of analysis, perfusion) were the same as described in example 7.

EP 2 158 213 B1

EP 2 158 213 B1

[0132] Current traces obtained for members of the Kv1 family (mKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.4ΔN, Kv1.5) in standard extracellular solution (control) are shown in Fig. 10A through 10E. In all cases cells were held at -120 mV holding potential and repeatedly depolarized to +50 mV to elicit the currents. The duration of the depolarizing pulses (indicated separately in each panel of Fig. 10) was set to allow full activation of the currents and minimize inactivation. In all cases sufficient time was allowed between pulses at the holding potential (-120 mV) for the complete recovery of the channels from any residual inactivation (interpulse intervals ranged from 15 to 30 seconds). The fast (N-type) inactivation removed version of hKv1.4 was used in this study (hKv1.4ΔN, the N-terminal 147 amino acids are deleted). In the absence of N-type inactivation the determination of the current block is easier and more accurate since the peak currents in this clone are not influenced by the very rapid inactivation process (time constant: 15-20 ms, [Kurata et al., 2004]). In the wild type channel due to the competition between time-dependent current activation and inactivation the peak currents are underestimated which complicates the analysis of current block.

[0133] Figure 10 shows current traces recorded before the application of the toxin (control), following the equilibration of block by 10 nM Vm24 and following wash-out (wash) of the toxin. The analysis of the panels indicates that hKv1.4 and Kv1.5 channels are practically insensitive to Vm24 (see also the bar graph in Fig. 12B). However, Vm24 in 10 nM concentration, which is ~3500 times the K_d for hKv1.3, blocks mKv1.1 channels (RCF=0.80±0.02, n=3) and hKv1.2 channels (RCF=0.54±0.08, n=3) significantly. Moreover, the blockade of hKv1.2 is not fully reversible. The blockade of hKv1.3 current at 10 nM Vm24 concentration (recorded in human T cells) is shown in Fig. 10C for easier comparison of the potency of Vm24 as a blocker of Kv1 channels (RCF=0.01±0.01, n=3). Due to the significant blockade of Kv1.1 and hKv1.2 currents, Vm24 was also tested in lower (1nM) concentration (Fig. 12A). At 1 nM concentration the RCF values were 0.97±0.02 (n=3) and 0.81±0.015 (n=3) for mKv1.1 and hKv1.2 currents, respectively. From the RCF values the affinity of Vm24 for these channels can be estimated from a model where 1 toxin molecule interacts with 1 channel to give K_d values between 30-40 nM for mKv1.1 and between 5-10 nM for hKv1.2. Considering the K_d determined for hKv1.3 (2.9 pM) the selectivity of Vm24 for hKv1.3 over mKv1.1 and hKv1.2 are at least ~ 10000-fold and 1500-fold, respectively.

[0134] The potency of Vm24 inhibiting the activity of other ion channels having significant biological effect and susceptibility to block by animal toxins was also determined. These included the rKv2.1 and hERG (Kv11.1) voltage-gated K channels, the Ca²⁺-activated K channel hBK (KCa1.1) and the cardiac voltage-gated sodium channel Na_v1.5. Fig. 11 shows representative whole-cell currents elicited with voltage protocols appropriate for a given channel in standard extracellular solution (control). Peak Kv2.1 and Na_v1.5 currents were determined from records obtained in response to depolarizations to +50mV and 0mV, respectively, from a holding potential of -120 mV (Figs. 11A and 11D). HEK293 cells expressing hERG channels were held at -80mV, depolarized to +20 mV for 2.5 s to activate and inactivate the channels (Fig. 11B). This was followed by a step to -40 mV at which inactivated channels quickly recover and the peak hERG current can be determined. This complicated voltage protocol is standard for recording hERG currents. BK channels are activated by the depolarization of the membrane (Fig. 11 B), however, the voltage dependence of the open probability depends on the intracellular free Ca²⁺ concentration. At a concentration of 5 micromolar free [Ca²⁺] applied in this study more than 50% of the channels are activated at +50 mV, thus, the comparison of the effects of Vm24 at membrane potentials identical to the ones used for other Kv channels is possible. Full activation of BK channels at +50 mV would require [Ca²⁺] incompatible with stable whole-cell recording, conversely, full activation of BK channels at 5 micromolar free [Ca²⁺] would require depolarizations to >+100 mV. Thus, the combination of 5 micromolar [Ca²⁺] and +50mV test potential was a reasonable compromise to study the effect of Vm24. The pulse to -120 mV preceding the test pulse was used for the assessment of the nonspecific leak. The holding potential between the pulse protocols was 0 mV at which all Kv channels fully inactivate thereby reducing the possibility of the contamination of the records by endogenous Kv currents sporadically found in tsA-201 cells. At this membrane potential BK channels are already active as it is demonstrated by the significant holding current at the beginning of the pulse.

[0135] To assay the effects of Vm24 on different channels shown in Fig. 11 cells were repeatedly depolarized to elicit currents in different extracellular solutions. Fig. 11 shows representative current traces recorded before the application of the toxin (control), following the application of 10 nM Vm24 for 4-7 min., and following wash-out (wash) of the toxin. All panels of Fig. 11 show that the currents recorded in the presence of Vm24 are indistinguishable from the ones recorded in control solution and after washout, indicating the lack of blockade of these channels. The statistical analysis is presented in Fig. 12B where the mean and the SEM of the remaining current fractions are shown in the presence of 10 nM Vm24 (n≥3).

[0136] Data presented in Fig. 12 indicate that the order of the blocking potency of Vm24 for various K channels is hKv1.3>>>hKv1.2>hKCa1>mKv1.1>>>hKv1.4=hKv1.5=rKv2.1=hERG=hBK=hNa_v1.5. Based on the K_d value obtained for hKv1.3 from the dose-response relationship and the single-point estimates of the K_d values for the other channels (i.e., calculated from data at 10 nM Vm24 and the remaining fraction of the current assuming 1:1 toxin-channel stoichiometry) the selectivity of Vm24 for hKv1.3 over other channels assayed in this study is >1500-fold. This value is well over the commonly accepted criteria for selectivity [Giangiacomo et al., 2004], which is defined as 100-fold difference in the equilibrium dissociation constant or a difference in binding free energy for an α-KTx binding to two different

potassium channels, Ch1 and Ch2 of $\Delta\Delta G_{Ch1,Ch2} > 2.72$ kcal/mol.

Example 9: Synthetic Vm24 is an equally potent blocker of hKv1.3 as the natural toxin

[0137] As described in Example 5, theoretical and practical considerations led to the chemical synthesis of Vm24. As described, the structure and the purity of the synthetic toxin were confirmed by analytical HPLC, amino acid sequence and mass spectrometry determination. All these approaches indicated that primary sequence of synthetic Vm24 (sVm24) is identical to that of the natural peptide. Moreover, the protocol for the generation of sVm24 used distinct protecting groups for the thiol groups designed to ensure that folding is restricted to the same disulfide pairing as in the native peptide. These data, however, do not guarantee that the biological activity of the peptide is maintained. The complementary surfaces of the channel and the peptide that mediate high affinity block are very complicated and minimal deviations from the structure of the native peptide might compromise the efficacy of sVm24 in blocking Kv1.3 [Giangiacomo et al., 2004].

[0138] The biological activity of sVm24 was assayed on Kv1.3 channels of human T cells. The experimental conditions for this study were exactly the same as described in Example 7. A whole-cell patch clamped T lymphocyte was depolarized repeatedly to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 30s in the presence of different solutions (Figure 13A). The hKv1.3 current measured in the absence of sVm24 (control) gradually, and almost completely disappeared upon the administration of 100 pM sVm24 via the perfusion apparatus. After the 16th pulse the recording chamber was perfused with toxin-free extracellular solution. The removal of the toxin from the perfusion solution did not result in a significant relief of hKv1.3 block within 5 minutes. This is demonstrated more clearly in Figure 13B where the peak currents; normalized to the ones recorded in control solution before sVm24 application (normalized peak), are shown as a function of time. Arrows indicate the start of the perfusion with sVm24 (100 pM sVm24) and the switching of the perfusion to toxin-free solution (wash-out). The remaining current fractions (RCF) measured after equilibration of the block with 100 pM of sVm24 or Vm24 are compared in Figure 13B (n=6 and n=4, respectively, bars indicate SEM). The statistical comparison (t-test) indicated that the RCFs are statistically not different between the two groups (p=0.57). Our conclusion is that sVm24 is as potent as the natural toxin in blocking hKv1.3 channels.

Example 10: Analysis of the biological activity of Vm23 on different ion channels

[0139] Scorpion venoms contain a plethora of biologically active peptides. The venom of a given species often contains peptides with high degree of sequence identity, as in case of Vm23 and Vm24 of *V. mexicanus* (see example 1). A high degree of sequence identity of the peptides usually confers identical biological activity to the individual molecules. This originates from the fact that interaction of peptide toxins with the toxin receptor located in the outer vestibule of ion channels is determined by multiple mechanisms, including long-range electrostatic, short-range electrostatic and close-contact interactions, and the net effect of these factors determine the binding affinity and selectivity [Park and Miller, 1992; Peter et al., 2001; Giangiacomo et al., 2004]. It has been shown previously that two peptides of the same scorpion (Pi2 and Pi3 of *P. imperator*), differing in a single amino acid only, both block Kv1.3 in sub-nanomolar concentrations [Peter et al., 2001]. From the pioneering work of Miller and co-workers [Goldstein et al., 1994] it is also evident that even non-conservative amino acid substitutions in several positions of charybdotoxin are well tolerated and the toxin retains its affinity for the *Shaker* potassium channel (e.g. T9K and N22K). In order to verify that the differences among Vm23 and Vm24 were not significant for changing their affinity and specificity towards Kv1.3 the pharmacological profile of Vm23, was also examined in detail as shown below.

[0140] The ion channel blocking potency of Vm23 was assayed for Kv1.3 channels of human T cells, and for mKv1.1, hKv1.2 and hKCa1 channels. These channels were included in the study based on the low affinity (mKv1.1, hKv1.2 and hKCa1) or high affinity block (hKv1.3) of these channels by the related peptide, Vm24, which shares 83% sequence identity with Vm23. The experimental conditions were exactly the same as described for the corresponding channels in Example 7 and Example 8.

[0141] A whole-cell patch clamped T lymphocyte was depolarized repeatedly to +50 mV from a holding potential of -120 mV every 15 s in the presence of different solutions (Figure 14A). The hKv1.3 current measured in the absence of Vm23 (control) almost completely disappeared within 3.5 min upon the administration of 10 nM Vm23 via the perfusion apparatus. The trace indicated as "10 nM Vm23" was recorded after the equilibration of the block. After the 19th pulse the recording chamber was perfused with toxin-free extracellular solution (wash-out). The removal of the toxin from the perfusion solution did not result in a significant relief of hKv1.3 block within 2 minutes. The remaining current fractions (RCF) measured after equilibration of the block with 10 nM Vm23 are shown in Figure 15 (n=3, bars indicate SEM). These results indicate that the characteristics of Vm23-mediated block of hKv1.3 channels are very similar to those of the Vm24-mediated block: the block is high affinity and the off rate of the toxin is extremely slow, beyond the time limits used in this assay. The limited amount of Vm23 (less than 0.5% of the venom is Vm23) precluded the determination of the dose-response relationship of hKv1.3 blockade and the proper statistical comparison of the dissociation constant

EP 2 158 213 B1

with that of Vm24.

[0142] The comparison of the currents recorded before (control), 3.5 minutes after the addition of 10 nM Vm23, and following the wash-out of the toxin (2 min.) show that 10 nM Vm23 practically does not block either hKCa channels (Fig. 14B) or mKv1.1 channels (Fig. 14C) (see experimental details in the corresponding sections of Example 7 and Example 8). The complete lack of hKCa blockade by Vm23 is different from the effect of Vm24, which blocked ~40% of the channels in the same concentration (see Fig. 9F). On the other hand, hKv1.2 channels were slightly blocked by 10 nM Vm23 (Fig. 14D) to give an RCF value of 0.91 ± 0.02 ($n=3$, SEM, Fig. 15), and the block was not readily reversible within 2 min. The same concentration of Vm24 blocked ~46% of the channels (see Example 8).

[0143] Comparison of the remaining current fractions for hKv1.3, hKCa, mKv1.1 and hKv1.2 in the presence of 10 nM Vm23 (Fig. 15) with the data obtained for Vm24 (Fig. 12 A and B) indicate that the selectivity profile of Vm 23 for hKv1.3 is slightly better for the tested channels. It can also be concluded from the comparison that despite the differences in the primary structure of Vm23 and Vm24, the high affinity block of hKv1.3 with remarkable selectivity is maintained.

Example 11: *In vivo* immunological effects of Vm24

[0144] Millions of people worldwide are affected by autoimmune diseases, such as but not limited to multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia, bone resorption periodontal disease, immune thrombocytopenic purpura and autoimmune lymphoproliferative syndrome, among others. It is currently thought that the onset of these diseases involves the activation of dormant disease specific autoreactive T cells, which are transformed into effector memory T cells (T_{EM}). The autoreactive T cells might differentiate from a naive state into continuously activated memory T cells due to repeated autoantigen stimulation and contribute to inflammatory damage by migrating into tissues, secreting inflammatory cytokines, and exhibiting immediate effector function [Sallusto et al., 1999]. The mechanism involved in delayed type hypersensitivity (DTH) is another example of skin lesion caused by T_{EM} cells [Soler et al., 2003]. The pathogenesis of many autoimmune diseases might also be due to memory B cells, especially those belonging to the class-switched CD27⁺IgD⁻ subset [Iglesias et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Corcione et al., 2004]. For these reasons it is desirable to develop therapeutic agents that could target selectively T_{EM} and class-switched memory B cells without impairing the activity of other lymphocyte subsets of cells, avoiding in this manner the compromise of acute immune responses. As mentioned earlier in examples 7 to 10 of this invention, voltage-gated Kv1.3 channels are new therapeutic targets for immunomodulation of T_{EM} and class-switched memory B cells. T_{EM} cells up-regulate Kv1.3 upon activation and their antigen-driven proliferation is quite sensitive to known substances that block Kv1.3 channels [Wulff et al., 2003]. On the contrary, naive and T_{CM} are much less sensitive to Kv1.3 blockers and rapidly become resistant to Kv1.3 blockade by up-regulating the calcium-activated K channel K_{Ca} 3.1 [Wulff et al., 2003; Chandy et al., 2004]. During the process of differentiation B cells and T cells change their potassium channel dependence from K_{Ca} 3.1 to Kv1.3 [Wulff et al., 2004]. Due to this fact Kv1.3 channel blockers inhibit the proliferation of these cells, without affecting naive and CD27⁺IgD⁺ memory cells. Thus the use of blockers specific for Kv1.3 channels would affect preferentially T_{EM} and class-switched memory B cells, without compromising the bulk of the immune response, but improving the health conditions developed as a consequence of the autoimmune diseases. Blockade of Kv1.3 channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), bone resorption in periodontal diseases, and DTH response in animal models without causing obvious side effects [Koo et al., 1997; Beeton et al., 2001; Valverde et al., 2004]. Since blockage of Kv1.3 channels by peptides is promptly reversible it allows controlling the course of the treatment, which is not the case when chemotherapeutic agents or monoclonal antibodies are used, which takes months to subside. Obviously a major problem is to find highly selective peptides for this therapeutic treatment [Chandy et al., 2004].

[0145] As shown in examples 7-10 described earlier, both peptides (Vm23 and Vm24), subject of this invention, are potent and very specific blockers of Kv1.3 channels *in vitro*. The experiments were conducted directly on human T-lymphocytes in culture as well as using other cells expressing several voltage dependent K channels, in order to verify selectivity of action. For the purpose of "proof-of-concept", experiments *in vivo* were conducted with rats sensitized with dinitrofluorobenzene (DNFB) as an agent capable of eliciting an important DTH-response.

[0146] In order to perform this kind of experiment we set up a protocol to study DTH response in rats. The system used is basically that described by Phanuphak et al., 1974. In brief, two groups of rats (3 or 5 animals each) were sensitized by applications of 40 microliters of 0.7% DNFB in 4:1 proportion of acetone: olive oil solution, in two consecutive days (days one and two), after gentle shaving of the dorsal-back region of the animals. After 7 days of the second application of the sensitizing solution, the animals were challenged by a single application of 20 microliter of 0.4% DNFB dissolved in the acetone: olive oil solution described above. This solution was spread over the dorsal surface of the right-side ears and allowed to dry, whereas the left-side ears were spread with only the vehicle solution (acetone:olive oil). On day eight of the protocol, a subcutaneous injection of 100 microliter of phosphate saline buffer pH 7.8 (PBS) was applied to each one of the animals used as control, whereas to the experimental group of rats, an amount of 10 micrograms pure Vm24 in 100 microliters PBS was subcutaneously applied. The thickness of both ears of all animals was measured

EP 2 158 213 B1

24 hours after of the application of Vm24.

[0147] The results of the experiments are shown in Fig.16. It can be clearly seen that the control animals, not receiving Vm24 injection, had a mean value of inflammation of the ear in the order of 0.32 mm (labeled control) whereas those rats that were treated with one dose of 10 micrograms Vm24 had a reduced inflammation, no more than 0.10 mm thickness. These values correspond to real inflammation processes, since the thickness of the unchallenged ears (left-side ears) were subtracted. This represents a net decrement over 60% of the inflammation process. In conclusion, these results support the idea that Vm24 is an important immunosuppressant agent for the DTH-response in rats. Thus it is certainly a leading component that deserves being assayed as an inhibitor of immunological diseases dependent of the activation of T and B lymphocytes, where the contribution of Kv1.3 channels is important for eliciting or maintaining the disease.

REFERENCES

[0148]

Aebersold R, Goodlett DR (2001). Mass Spectrometry in Proteomics. Chem. Rev. 101:269-95.
 Ahem CA, Zhang JF, Wookalis MJ, Horn R (2005). Modulation of the cardiac sodium channel NaV1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. Circ Res 96:991-8
 Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson DC, Simon M, Dethlefs B, Lee C-L, Hell JE, Gutman GA, Chandy KG (1995). Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. Neuron 15:1169-81.
 Alessandri-Haber N, Lecoq A, Gasparini S, Grangier-Macmath G, Jacquet G, Harvey AL, de Medeiros C, Rowan EG, Gola M, Menez A, Crest M (1999). Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3. Clues to design analogs with enhanced selectivity. J Biol Chem 274:35653-61.
 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-10.
 Aneiros A, Garcia I, Martinez JR, Harvey AL, Anderson AJ, Marshall DL, Engstrom A, Hellman U, Karlsson E (1993). A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone Bunodosoma granulifera. Isolation, amino acid sequence and biological activity. Biochim Biophys Acta 1157:86-92.
 Auguste P, Hugues M, Grave B, Gesquiere JC, Maes P, Tartar A, Romey G, Schweitz H, Lazdunski M (1990). Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. J Biol Chem 265:4753-9.
 Avdonin V, Tang XD, Hoshi T (2003). Stimulatory action of internal protons on Slo1 BK channels. Biophys J 84:2969-80
 Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gaspar R, Possani LD, Panyi G (2005). Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the α -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa ion channels of human T lymphocytes. Mol Pharmacol 67:1034-44
 Batista CV, Roman-Gonzalez SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Possani LD (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion Tityus stigmurus: Biochemical and physiological comparison with other Tityus species. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol (doi: 10.1016/j.cbpc.2006.12.004).
 Beeton C, Wulff H, Barbara J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E (2001). Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 98:13942-7.
 Beeton C, Chandy KG (2005). Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis. Neuroscientist 11:550-62.
 Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, Khaytin I, Calabresi PA, Chen CY, Gutman GA, Chandy KG (2005). Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. Mol Pharmacol 67:1369-81.
 Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, Leehealey CJ, Andrews S, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, KnausHG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG (2006). Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. Proc Natl Acad Sci USA 103:17414-9
 Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A (1982). Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. Nature 296:90-1.
 Castaneda O, Sotolongo V, Amor AM, Stocklin R, Anderson AJ, Harvey AL, Engstrom A, Wernstedt C, Karlsson E (1995). Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone Stichodactyla helianthus. Toxicon 33:603-13.
 Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH (1989). Toxins in the characterization of potassium channels. Trends Neurosci 12:59-65.
 Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD (2004). K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. Trends Pharmacol Sci 25:280-9:

EP 2 158 213 B1

Cooper N, Bussell J (2006). The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 133:364-74.

Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, Gambini C, Mancardi GL, Uccelli A, Pistoia V. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11064-9.

5 Crest M, Jacquet G, Gola M, Zerrouk H, Benslimane A, Rochat H, Mansuelle P, Martin-Eauclaire MF (1992). Kalitoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2+)-activated K+ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J Biol Chem* 267:1640-7.

Deutsch C, D Krause, SC Lee (1986). Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J Physiol (Lond)* 372:405-23

10 Diego-Garcia E, Schwartz EF, D'Suze G, Gonzalez SA, Batista CV, Garcia BI, Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2007). Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides* 28:31-7.

Doyle DA, CJ Morais, RA Pfueter, A Kuo, M Gulbis, SL Cohen, BT Chait, R MacKinnon (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77

15 Drakopoulou E, Cotton J, Virelizier H, Bernardi E, Schools AR, Partiseti M, Choquet D, Gurrula G, Possani LD, Vita C (1995). Chemical synthesis, structural and functional characterisation of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage-dependent K+ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 213:901-7.

Fanger CM, H Rauer, Neben AL, Miller MJ, Wulff H, Rosa JC, Ganellin CR, Chandy KG, Cahalan MD (2001). Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem* 276:12249-56

20 Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S (1997). Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K+ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 80:572-79

Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083-90.

25 Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994). Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K+ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33:6834-9.

Garcia ML, Gao Y, McManus OB, Kaczorowski GJ (2001). Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39:739-48.

30 Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1993). Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268:18866-74.

Giangiacomo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ (2004). Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon* 43:877-86.

35 Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2000). Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275:37137-49

Giangiacomo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ (2004). Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon* 43:877-86

Goldstein SA, Miller C (1993). Mechanism of Charybdotoxin block of a voltage-gated K+ channel. *Biophys J* 65:1613-1619

40 Goldstein SA, Pheasant DJ, Miller C (1994). The Charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12:1377-88

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508.

45 Grissmer S, Dethlefs B, Wasmuth JJ, Goldin AL, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (1990). Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K+ channel gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9411-5.

Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (1994). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K+ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45:1227-34

50 Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD (1993). Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, pharmacology. *J Gen Physiol* 102:601-30

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508

55 Harvey AL (1997). Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen Pharmacol* 28:7-12.

Hidalgo P, MacKinnon R (1995). Revealing the architecture of a K+ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* 268:307-10.

EP 2 158 213 B1

Huelsensbeck JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-5.

Iglesias A, Bauer J, Litzenburger T, Schubart A, Lington C (2001). T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36:220-34.

5 Imme D, Wood M, Kiss L, Korn SJ (1999). Potassium-dependent changes in the conformation of the Kv2.1 potassium channel pore. *J Gen Physiol* 113:819-36

Jameson BA, McDonnell JM, Marini JC, Korngold R (1994). A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 368:744-6.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001). *Immunobiology*. 5 ed. Garland Publishing, New York. 187-220 pp

Jouirou B, Mouhat S, Andreotti N, De Waard M, Sabatier JM (2004). Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K+ channels. *Toxicon* 43:909-14.

10 Judge SI, Bever CT Jr (2006). Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol Ther* 111:224-59.

Juvvadi P, Vunnam S, Merrifield RB (1996). Synthetic melittin, its enantio, retro, and retroenantio isomers, and selected chimeric analogs: their antibacterial, hemolytic, and lipid bilayer action. *J Am Chem Soc* 118:8989-97.

15 Kalman K, MW Pennington, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnr V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (1998). ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem* 273:32697-707

Koch RO, Wanner SG, Koschak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, Knaus HG (1997). Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K+ channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol Chem* 272:27577-81

20 Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotina A, Shah K, Mulvany K, Hora D Jr, Cunningham P, Wunderler DL, McManus OB, Slaughter R, Bugianesi R, Felix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer MS, Feeney W (1997). Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 158:5120-8.

Krezel AM, Kasibhatla C, Hidalgo P, MacKinnon R, Wagner G (1995). Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Sci* 4:1478-89.

25 Kurata HT, Wang Z, Fedida D (2004). NH2-terminal inactivation peptide binding to C-type-inactivated Kv channels. *J Gen Physiol* 123:505-20

Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, Pongs O, Nakajima T (1997). A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K+ channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J* 328 :321-7.

30 Lee SY, Lee A, Chen J, MacKinnon R (2005). Structure of the KvAP voltage-dependent K+ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15441-6.

Lerner EC, Qian Y, Blaskovich MA, Fossum RD, Vogt A, Sun J, Cox AD, Der CJ, Hamilton AD, Sebt SM (1995). Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* 270:26802-6.

35 Lewis RS, Cahalan MD (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 13:623-53.

Lewis RS (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19:497-521

Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K+ channel. *Science* 309:897-903.

40 Matteson DR, Deutsch C (1984). K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307:468-71

Merrifield RB (1964). Solid-phase peptide synthesis. 2. An improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry* 3:1385-90.

Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca2+-activated K+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-8.

45 Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M, Sabatier JM (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* 378:717-26.

Moczydlowski E (1985). Chemical basis for alkali cation selectivity in potassium-channel proteins. *Chem Biol* 5: R291-301.

50 O'Connor K, Bar-Or A, Hafner DA (2001). The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 21:81-92.

O'Leary ME, Chen LQ, Kallen RG, Horn R (1995). A molecular link between activation and inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 106:641-58

55 Oren H, Ozkal S, Gulen H, Duman M, Ucar C, Atabay B, Yilmaz S, Kargi A, Irken G (2002). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: report of two cases and review of the literature. *Ann Hematol* 81:651-3.

Orengo CA, Thornton JM (2005). Protein families and their evolution-a structural perspective. *Annu Rev Biochem* 74:867-900.

Panyi G, Varga Z, Gaspar R (2004). Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett* 92:55-66

EP 2 158 213 B1

Panyi G, Possani LD, Rodriguez de la Vega RC and Vaiga Z (2006). K+ channel blockers: Novel Tools to Inhibit T cell Activation leading to specific immunosuppression. *Curr Pharm Des* 12: 2199-2220.

Park CS, Miller C (1992). Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* 31:7749-55

5 Patel SP, Campbell DL (2005). Transient outward potassium current, 'I_{to}', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 569:7-39

Pearson WR, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-8.

10 Pennington MW, Byrnes ME, Zaydenberg I, Khaytin I, de Chastonay J, Krafte DS, Hill R, Mahnir VM, Volberg WA, Gorczyca W, Kem WR (1995). Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Int J Pept Protein Res* 46:354-8.

Peter J, Varga Z, Hajdu P, Gaspar RJ, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G (2001). Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 179:13-25

15 Phanuphak P, Moorhead JW, Claman HN (1974) Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. I. In vivo detection by ear swelling and correlation with in vitro cell stimulation. *J. Immunol.* 112:115-23.

Possani LD, Martin BM, Svendsen I, Rode GS, Erickson BW (1985). Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem J* 229:739-50.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem* 264:287-300.

20 Possani LD, Rodriguez de la Vega RC (2006). Scorpion venom peptides. In: *Handbook of biologically active peptides* p.339-354 (Kastin, A. editor). Academic Press, San Diego CA, USA.

Peter J, Varga Z, Hajdu P, Gaspar RJ, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G (2001). Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 179:13-25

25 Rogart RB, Cribbs L, Muglia LK, Kephart DD, Kaiser MW (1989). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8170-4

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-4.

Rauer H, Lanigan MD, Pennington MW, Aiyar J, Ghanshani S, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (2000). Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca²⁺-activated over voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* 275:1201-8.

30 Rodriguez de la Vega RC, Merino E, Becerril B, Possani LD (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol Sci* 24:222-7.

Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43:865-75.

35 Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-12.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-63

Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440:463-9

40 Sarin VK, Kent SBH, Tam JP, Merrifield BR (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem* 117:147-57

Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ (2003). CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 101:1677-82.

45 Stampe P, Kolmakova-Partensky L, Miller C (1994). Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* 33:443-50.

Strong PN (1990). Potassium channel toxins. *Pharmacol Ther* 46:137-62.

Sugg EE, Garcia ML, Reuben JP, Patchett AA, Kaczorowski GJ (1990). Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* 265: 18745-8.

50 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-82.

Thornton JW, DeSalle R (2000). Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:41-73.

Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, Possani LD (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci* 20:444-7.

55 Valdez-Cruz NA, Batista CV, Possani LD (2004). Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur J Biochem* 271:1453-64.

EP 2 158 213 B1

Valverde P, Kawai T, Taubman MA (2004). Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res* 19:155-64.

Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hansel W, Chandy KG (2004). Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxy-psoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol* 65:1364-1374

5 Viglietta V, Kent SC, Orban T, Hafler DA (2002). GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest* 109:895-903

Visan V, Fajloun Z, Sabatier JM, Grissmer S (2004). Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1.2, hKv1.3, hKCa1 channels. *Mol Pharmacol* 66:1103-12

10 Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:463-472

Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2001). Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* 276:32040-5

Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG (2003). The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 111:1703-13.

15 Wulff H, Knaus HG, Pennington M, Chandy KG (2004). K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol* 173:776-86.

Yamashita K, Choi U, Woltz PC, Foster S, Sneller MC, Hakim FT, Fowler DH (2004). Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4⁺ effector memory cells relative to central memory cells. *Blood* 103:3986-8

20 Zamudio FZ, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P, Possani LD (1992). Amino acid sequence an immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem* 204:281-92.

Zamudio FZ, Conde R, Arevalo C, Becerril B, Martin BM, Valdivia HH, Possani LD (1997). The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J Biol Chem* 272:11886-94.

25 Zhu S, Huys I, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J (200). Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. *Proteins* 54:361-70.

Zweifach A, Lewis RS (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6295-99.

SEQUENCE LISTING

[0149]

35 <110> UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSSANI POSTAY, Lourival Domingos
GURROLA-BRIONES, Georgina
SALAS-CASTILLO, Saida Patricia
FERREIRA BATISTA, Cesar Vicente

40 VARGA, Zoltán S.
PANYI, György
GÁSPÁR Rezső
<120> Vm23 and Vm24, two scorpion peptides that block human T-lymphocyte potassium channels (sub-type Kv1.3) with high selectivity

45 <130> Vm
<160> 3
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
50 <211> 35
<212> PRT
<213> Vaejovis mexicanus smithi

<400> 1
55

EP 2 158 213 B1

Ala Ala Ala Ile Ser Cys Val Gly Ser Lys Glu Cys Leu Pro Lys Cys
1 5 10 15
Lys Ala Gln Gly Cys Lys Ser Gly Lys Cys Met Asn Lys Lys Cys Lys
5 20 25 30
Cys Tyr Cys
35
<210> 2
<211> 36
<212> PRT
<213> Vaejovis mexicanus smithi
<400> 2
Ala Ala Ala Ile Ser Cys Val Gly Ser Pro Glu Cys Pro Pro Lys Cys
1 5 10 15
Arg Ala Gln Gly Cys Lys Asn Gly Lys Cys Met Asn Arg Lys Cys Lys
20 25 30
Cys Tyr Tyr Cys
35
<210> 3
<21.1> 36
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> CAN BE ISOLATED From Vaejovis mexicanus smithi OR ARTIFICIALLY SYNTHETISED
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa can be any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even
40 better Lys or Pro
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa can be any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even
45 better Leu or Pro
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Xaa can be any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even
50 better Lys or Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa can be any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even
55 better Ser or Asn
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)

EP 2 158 213 B1

<223> Xaa can be any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even
better Lys or Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (35)..(35)
<223> Xaa can be any amino acid providing it does not disrupt the three dimensional folding of the protein or even
better Tyr or none at all
<400> 3
Ala Ala Ala Ile Ser Cys Val Gly Ser Xaa Glu Cys Xaa Pro Lys Cys
1 5 10 15
Xaa Ala Gln Gly Cys Lys Xaa Gly Lys Cys Met Asn Xaa Lys Cys Lys
15 20 25 30
Cys Tyr Xaa Cys
35
20
Claims
1. An isolated and purified peptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:
1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3 and functional equivalent analogs thereof, said functional equivalent analogs sharing
25 at least 83% pairwise sequence identity over the 36 aligned positions of SEQ ID NO: 3, said peptide being capable
of blocking with high affinity and specificity a potassium channel Kv1.3.
2. A peptide as defined in claim 1 for use in attenuating calcium signaling pathway in -T-lymphocyte cells of a mammal,
30 wherein the use comprises contacting a population of said T-lymphocyte cells with the peptide, preferably wherein
said mammal is a human.
3. An in-vitro method of inhibiting Kv1.3 potassium channel activity in a mammalian cell, comprising contacting said
mammalian cell with an effective amount of a peptide as defined in claim 1 or a pharmaceutically acceptable salt
35 thereof, preferably wherein said mammalian cell is a human lymphocyte cell.
4. An in-vitro method of attenuating calcium signaling pathway in a T-lymphocyte cell comprising contacting said T-
lymphocyte cell with an affective amount of a peptide as defined in claim 1.
40 5. A peptide as defined in claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in suppressing T-cell activation
process in the immune system of a mammal, wherein the use comprises contacting a population of said T-cells with
the peptide, preferably wherein said mammal is a human.
6. The peptide of claim 5, wherein said T-cell activation is caused by an immune response in said mammal, preferably
45 wherein said immune response is the result of heterologous organ rejection or preferably wherein said immune
response is the result of an autoimmune disease.
7. A composition comprising a peptide as defined in claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in
suppressing an immune response in mammals, preferably wherein said immune response is the result of heterol-
50 ogous organ rejection or preferably wherein said immune response is the result of an autoimmune disease.
8. A composition comprising a peptide as defined in claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in
the prophylactic or therapeutic treatment of heterologous organ rejection in a subject in need thereof, preferably
wherein said rejected organ is a heart, a lung, a liver, a kidney or a pancreas, or wherein the subject in need of said
55 treatment is a human.
9. A composition comprising a peptide as defined in claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in
the prophylactic or therapeutic treatment of an autoimmune disease associated to lymphocyte T_{EM} in a subject in
need thereof, preferably wherein the subject in need of said treatment is a human, or wherein said autoimmune

EP 2 158 213 B1

disease associated to lymphocyte T_{EM} is selected from the group consisting of multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, autoimmune psoriasis, lupus erythematosus, ulcerative colitis, sympathetic ophthalmia, bone resorption periodontal disease, immune thrombocytopaenic purpura and autoimmune lymphoproliferative syndrome.

- 5 10. The composition of claim 9, further comprising at least one additional immunosuppressive agent to be administered to said subject, preferably wherein the additional immunosuppressive agent is selected from the group consisting of cyclosporine, rapamycin, azathioprine, prednisone, ShK toxin, ShK derivatives and deoxyspergualin, their derivatives, or a salt thereof.
- 10 11. A pharmaceutical composition comprising at least one peptide as defined in claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier, and optionally at least one additional immunosuppressive agent, preferably wherein the optional additional immunosuppressive agent is selected from the group consisting of cyclosporine, rapamycin, azathioprine, prednisone, ShK toxin, ShK derivatives and deoxyspergualin, their derivatives, or a salt thereof.
- 15 12. The composition of claim 8 or claim 9, which is suitable to be administered topically, systemically, intravenously, intraperitoneally, intramuscularly, subcutaneously, intranasally, transdermally, orally, or by intradermal injection, intrabronchial instillation, gastrointestinal delivery, or transmucosal delivery.
- 20 13. A peptide according to claim 1 which further comprises a labeling moiety.
- 25 14. The labeled peptide of claim 13, wherein the labeling moiety is selected from the group consisting of a radioactive isotope, a fluorescent moiety, a chemiluminiscent moiety, a chromophore, a ligand such as biotin and a protein, preferably wherein the labeling protein is an antibody or green fluorescent protein or a protein derived from the green fluorescent protein with distinct emission spectra.
- 30 15. An in-vitro method for identification of cells expressing Kv1.3 channels comprising the steps of: a) contacting a population of the target cells with a labeled peptide as defined in claim 13 or claim 14; and b) detecting the labeled peptide bond to the Kv1.3 potassium channels present in said population of target cells by a detection technique, preferably wherein said cells are human lymphocytes.
- 35 16. An in-vitro method for quantification of the number of Kv1.3 channels expressed in a given cell, comprising the steps of: a) contacting said cell with labeled peptide as defined in claim 13 or claim 14; and b) detecting and quantifying the labeled peptide bond to the Kv1.3 potassium channels present in said population of target cells by a quantitative detection technique, preferably wherein said cells are human lymphocytes.

Patentansprüche

- 40 1. Isoliertes und gereinigtes Peptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID No:1, SEQ ID No:2, SEQ ID No:3 und funktionell gleichwertigen Analogen davon, wobei die funktionell gleichwertigen Analoge einen Anteil von mindestens 83% paarweiser Sequenz Identität über die 36 miteinander alignierten Positionen der SEQ ID No:3 aufweisen, wobei das Peptid in der Lage ist, einen Kaliumkanal Kv1.3 mit hoher Affinität und Spezifität zu blockieren.
- 45 2. Peptid nach Anspruch 1 für den Einsatz zur Dämpfung der Kalziumsignalbahn in T-Lymphozyten-Zellen eines Säugetieres, wobei der Einsatz das Zusammenbringen eines Bestandes der T-Lymphozyten-Zellen mit dem Peptid umfasst, wobei das Säugetier vorzugsweise ein Mensch ist.
- 50 3. In-vitro-Methode zur Hemmung der Kv1.3 Kaliumkanalaktivität in einer Säugetierzelle, umfassend das Zusammenbringen der Säugetierzelle mit einem wirksamen Anteil eines Peptids nach Anspruch 1 oder eines als Arzneimittel geeigneten Salzes davon, wobei die Säugetierzelle vorzugsweise eine menschliche Lymphozyt-Zelle ist.
- 55 4. In-vitro-Methode zur Dämpfung der Kalziumsignalbahn in einer T-Lymphozyt-Zelle, umfassend das Zusammenbringen der T-Lymphozyt-Zelle mit einem wirksamen Anteil eines Peptids nach Anspruch 1.
- 5 5. Peptid nach Anspruch 1 oder ein als Arzneimittel geeignetes Salz davon für den Einsatz zur Unterdrückung des Aktivierungsprozesses der T-Zelle im Immunsystem eines Säugetieres, wobei der Einsatz das Zusammenbringen

EP 2 158 213 B1

eines Bestandes der T-Zellen mit dem Peptid umfasst, wobei das Säugetier bevorzugt ein Mensch ist.

- 5 6. Peptid nach Anspruch 5, wobei die Aktivierung der T-Zelle durch eine Immunreaktion in dem Säugetier hervorgerufen wird, wobei die Immunreaktion vorzugsweise das Ergebnis einer heterologen Organabstoßung ist oder wobei die Immunreaktion vorzugsweise das Ergebnis einer Autoimmunkrankheit ist.
- 10 7. Zusammensetzung umfassend ein Peptid nach Anspruch 1 oder ein als Arzneimittel geeignetes Salz davon für den Einsatz zur Unterdrückung einer Immunreaktion in Säugetieren, wobei die Immunreaktion vorzugsweise das Ergebnis einer heterologen Organabstoßung ist oder wobei die Immunreaktion vorzugsweise das Ergebnis einer Autoimmunkrankheit ist.
- 15 8. Zusammensetzung umfassend ein Peptid nach Anspruch 1 oder ein als Arzneimittel geeignetes Salz davon für den Einsatz bei einer prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung einer heterologen Organabstoßung in einem Versuchsobjekt, das eine solche Behandlung benötigt, wobei das abgestoßene Organ vorzugsweise ein Herz, ein Lunge, eine Leber, eine Niere oder eine Bauchspeicheldrüse ist, oder wobei das Versuchsobjekt, das eine solche Behandlung benötigt, ein Mensch ist.
- 20 9. Zusammensetzung umfassend ein Peptid nach Anspruch 1 oder ein als Arzneimittel geeignetes Salz davon für den Einsatz zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung einer mit Lymphozyt T_{EM} zusammenhängenden Autoimmunkrankheit in einem Versuchsobjekt, das eine solche Behandlung benötigt, wobei das Versuchsobjekt, das eine solche Behandlung benötigt vorzugsweise ein Mensch ist, oder wobei die mit Lymphozyt T_{EM} zusammenhängende Autoimmunkrankheit vorzugsweise aus der Gruppe bestehend aus multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis, Typ 1 Diabetes, autoimmune Schuppenflechte, Lupus Erythematosus, colitis ulcerosa, sympathische Ophthalmia, Knochenresorption Periodontitis, Immunthrombozytopenische Purpura und Autoimmun-Lymphoproliferatives Syndrom ausgewählt ist.
- 25 10. Zusammensetzung nach Anspruch 9, zusätzlich umfassend mindestens ein zusätzliches dem Versuchsobjekt zu verabreichendes immunsuppressives Mittel, wobei das zusätzliche immunsuppressive Mittel vorzugsweise aus der Gruppe bestehend aus Cyclosporin, Rapamycin, Azathioprin, Prednison, ShK-Toxin, ShK-Derivate und Deoxyspergualin, deren Derivate oder Salze davon ausgewählt ist.
- 30 11. Arzneimittelzusammensetzung umfassend mindestens ein Peptid nach Anspruch 1 oder ein als Arzneimittel geeignetes Salz davon und einen als Arzneimittel geeigneten Träger und wahlweise mindestens ein zusätzliches immunsuppressives Mittel, wobei das wahlweise zusätzliche immunsuppressive Mittel aus der Gruppe bestehend aus Cyclosporin, Rapamycin, Azathioprin, Prednison, ShK-Toxin, ShK-Derivate und Deoxyspergualin, deren Derivate oder Salze davon ausgewählt ist.
- 35 12. Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Zusammensetzung geeignet ist, topisch, systemisch, intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intranasal, transdermal, oral oder durch intradermale Injektion, intrabronchiales Einträufeln, gastrointestinale Zuführung oder transmukosale Zuführung verabreicht zu werden.
- 40 13. Peptid nach Anspruch 1, wobei das Peptid zusätzlich eine Markierungsgruppe umfasst.
- 45 14. Markiertes Peptid nach Anspruch 13, wobei die Markierungsgruppe aus der Gruppe bestehend aus einem radioaktiven Isotop, einer fluoreszierenden Gruppe, einer Chemilumineszenz-Gruppe, einem Chromophor, einem Liganden, wie z.B. Biotin, und einem Protein, wobei das Markierungsprotein vorzugsweise ein Antikörper oder ein grün fluoreszierendes Protein oder ein aus einem grün fluoreszierenden Protein erhaltenes Protein mit einem ausgeprägten Emissionsspektrum ausgewählt ist.
- 50 15. In-vitro-Methode zur Identifizierung von Kv1.3-Kanäle wiedergebenden Zellen umfassend die Schritte: a) Zusammenbringen eines Bestandes der Zielzellen mit einem markierten Peptid nach Anspruch 13 oder 14; und b) Detektieren der Bindung des markierten Peptids zu den in dem Bestand der Zielzellen vorhandenen Kv1.3-Kalium-Kanälen durch eine quantitative Detektionstechnik, wobei die Zellen bevorzugt menschliche Lymphozyten sind.
- 55 16. In-vitro-Methode zur Quantifizierung der Anzahl der wiedergegebenen Kv1.3-Kanäle in einer vorgegebenen Zelle umfassend die Schritte: a) Zusammenbringen der Zelle mit einem markierten Peptid nach Anspruch 13 oder 14; und Detektieren und Quantifizieren der Bindung des markierten Peptids zu den in dem Bestand der Zielzellen vorhandenen Kv1.3-Kanälen durch eine quantitative Detektionstechnik, wobei die Zellen bevorzugt menschliche

EP 2 158 213 B1

Lymphozyten sind.

Revendications

1. Peptide isolé et purifié ayant une séquence d'acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué des séquences SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3 et leurs analogues équivalents fonctionnels, lesdits analogues équivalents fonctionnels ayant au moins 83% d'identité de séquence par paires sur les 36 positions alignées de la séquence SEQ ID N°: 3, ledit peptide étant capable de bloquer avec une affinité et une spécificité élevées un canal potassique Kv1.3.
2. Peptide selon la revendication 1, destiné à être utilisé pour atténuer la voie de signalisation calcique dans des lymphocytes T chez un mammifère, dans lequel l'utilisation comprend la mise en contact d'une population desdits lymphocytes T avec le peptide, ledit mammifère étant de préférence un être humain.
3. Procédé in vitro d'inhibition de l'activité du canal potassique Kv1.3 dans une cellule de mammifère, comprenant la mise en contact de ladite cellule de mammifère avec une quantité efficace d'un peptide selon la revendication 1 ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ladite cellule de mammifère étant de préférence un lymphocyte humain.
4. Procédé in vitro d'atténuation de la voie de signalisation calcique dans un lymphocyte T comprenant la mise en contact dudit lymphocyte T avec une quantité efficace d'un peptide selon la revendication 1.
5. Peptide selon la revendication 1, ou sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, destiné à être utilisé pour supprimer le processus d'activation de cellules T dans le système immunitaire d'un mammifère, l'utilisation comprenant la mise en contact d'une population desdites cellules T avec le peptide, ledit mammifère étant de préférence un être humain.
6. Peptide selon la revendication 5, dans lequel ladite activation de cellules T est provoquée par une réponse immunitaire chez ledit mammifère, ladite réponse immunitaire étant de préférence le résultat d'un rejet d'organe hétérologue ou ladite réponse immunitaire étant de préférence le résultat d'une maladie auto-immune.
7. Composition comprenant un peptide selon la revendication 1, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, destinée à supprimer une réponse immunitaire chez des mammifères, ladite réponse immunitaire étant de préférence le résultat d'un rejet d'organe hétérologue ou ladite réponse immunitaire étant de préférence le résultat d'une maladie auto-immune.
8. Composition comprenant un peptide selon la revendication 1, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, destinée à être utilisée dans le traitement prophylactique ou thérapeutique d'un rejet d'organe hétérologue chez un sujet nécessitant un tel traitement, ledit organe rejeté étant de préférence un coeur, un poumon, un foie, un rein ou un pancréas, ou le sujet nécessitant un tel traitement étant un être humain.
9. Composition comprenant un peptide selon la revendication 1 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, destinée à être utilisée dans le traitement prophylactique ou thérapeutique d'une maladie auto-immune associée au lymphocyte T_{EM} chez un sujet nécessitant un tel traitement, le sujet nécessitant ledit traitement étant de préférence un être humain, ou ladite maladie auto-immune associée au lymphocyte T_{EM} étant sélectionnée dans le groupe constitué de la sclérose en plaques, de la polyarthrite rhumatoïde, d'un diabète de type I, d'un psoriasis auto-immun, d'un lupus érythémateux, d'une rectocolite hémorragique, d'une ophtalmie sympathique, d'une maladie périodontale de résorption osseuse, d'un purpura thrombocytopénique immun et d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun.
10. Composition selon la revendication 9, comprenant en outre au moins un agent immunosuppresseur supplémentaire destiné à être administré audit sujet, l'agent immunosuppresseur supplémentaire étant de préférence sélectionné dans le groupe constitué de la cyclosporine, de la rapamycine, de l'azathioprine, de la prednisone, de la toxine ShK, de dérivés de ShK et de désoxyspergualine, leurs dérivés, ou un sel de ceux-ci.
11. Composition pharmaceutique comprenant au moins un peptide selon la revendication 1 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, facultativement, au moins un agent immunosuppresseur supplémentaire, l'agent immunosuppresseur supplémentaire facultatif étant sélectionné dans

EP 2 158 213 B1

le groupe constitué de la cyclosporine, de la rapamycine, de l'azathioprine, de la prednisone, de la toxine ShK, de dérivés de ShK et de désoxyspergualine, leurs dérivés, ou un sel de ceux-ci.

12. Composition selon la revendication 8 ou la revendication 9, apte à être administrée par voie topique, systémique, intraveineuse, intrapéritonéale, intramusculaire, sous-cutanée, intranasale, transdermique, orale, ou par injection intradermique, instillation intrabronchique, administration gastro-intestinale, ou administration transmucoale.
13. Peptide selon la revendication 1, comprenant en outre un fragment de marquage.
14. Peptide marqué selon la revendication 13, dans lequel le fragment de marquage est sélectionnée dans le groupe constitué d'un isotope radioactif, d'un fragment fluorescent, d'un fragment chimi-luminescent, d'un chromophore, d'un ligand tel qu'une biotine et qu'une protéine, la protéine de marquage étant de préférence un anticorps ou une protéine fluorescente verte ou une protéine dérivée d'une protéine fluorescente verte avec des spectres d'émission distincts.
15. Procédé in vitro pour l'identification de cellules exprimant des canaux Kv1.3 comprenant les étapes consistant à: a) mettre en contact une population des cellules cibles avec un peptide marqué selon la revendication 13 ou la revendication 14 ; et b) détecter la liaison entre le peptide marqué et les canaux potassiques Kv1.3 présents dans ladite population de cellules cibles par une technique de détection, lesdites cellules étant de référence des lymphocytes humains.
16. Procédé in vitro pour la quantification du nombre de canaux Kv1.3 exprimés dans une cellule donnée, comprenant les étapes consistant à: a) mettre en contact ladite cellule avec un peptide marqué selon la revendication 13 ou la revendication 14; et b) détecter et quantifier la liaison du peptide marqué avec les canaux potassiques Kv1.3 présents dans ladite population de cellules cibles par une technique de détection quantitative, lesdites cellules étant de préférence des lymphocytes humains.

EP 2 158 213 B1

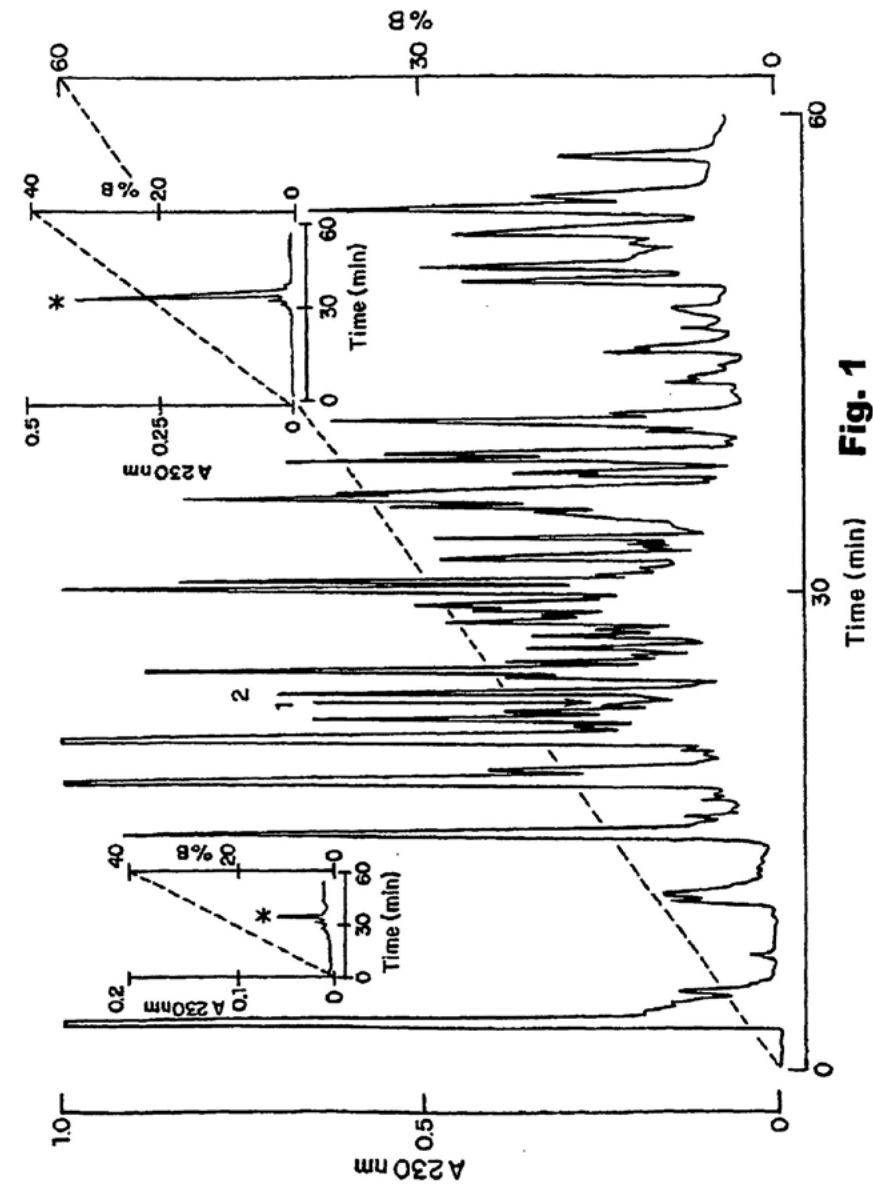


Fig. 1

EP 2 158 213 B1

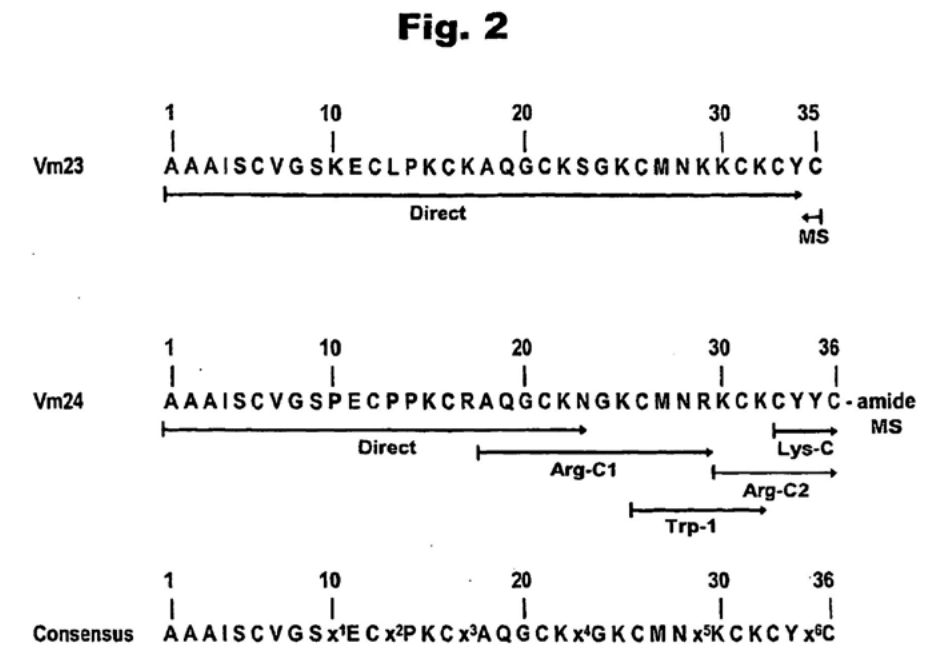




Fig. 3

EP 2 158 213 B1

Fig. 4

- 1) [M + H]⁺ 788.0

A	Q	G	C	K
			Y	C

- 2) [M + H]⁺ 560.4

C	R
C	Y

EP 2 158 213 B1

EP 2 158 213 B1

Fig. 5

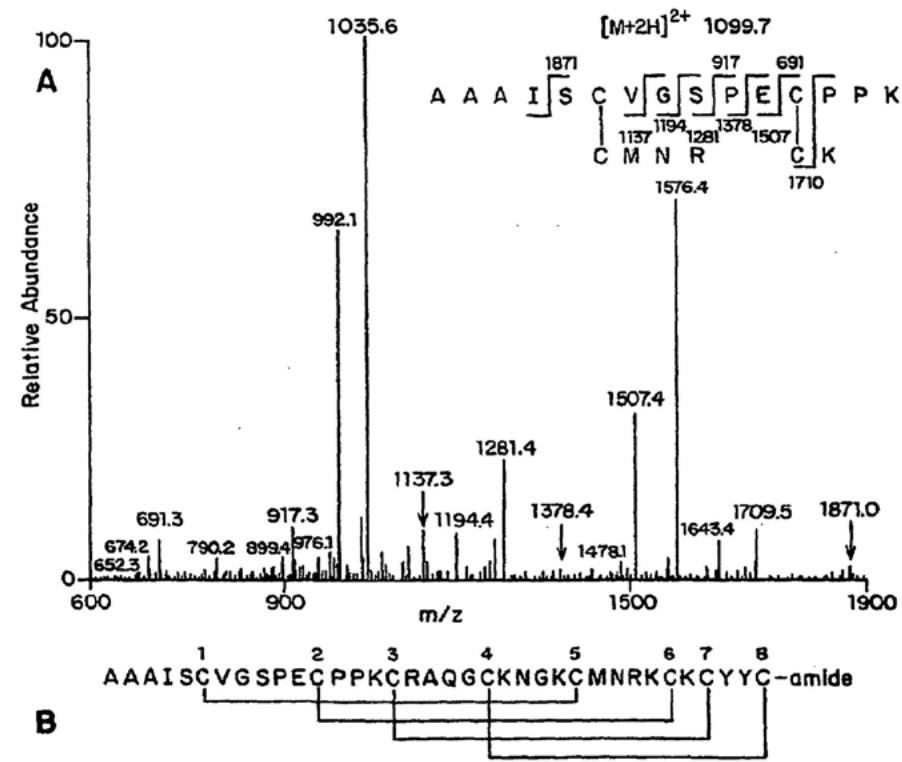
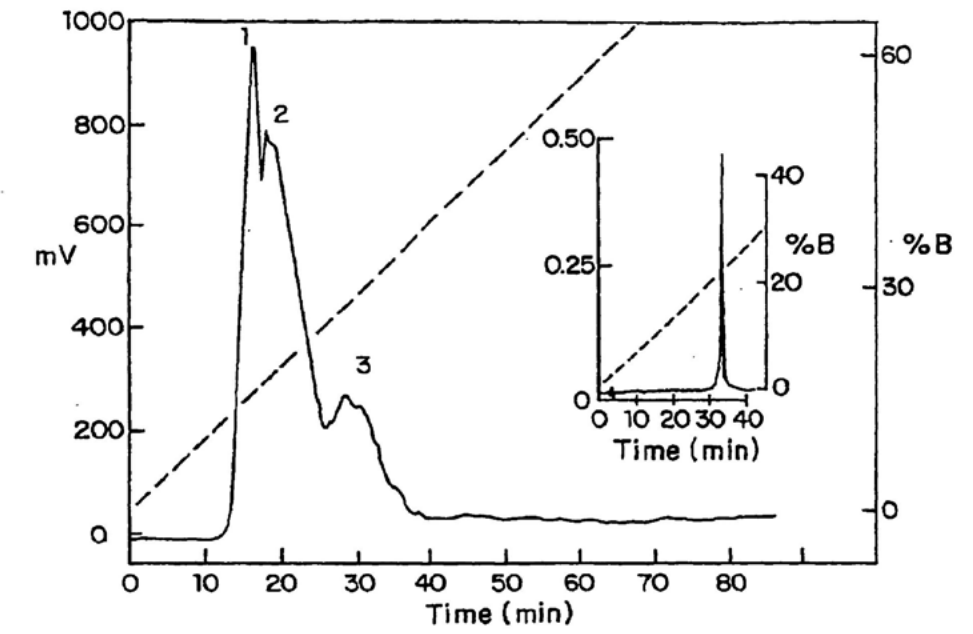


Fig. 6



EP 2 158 213 B1

EP 2 158 213 B1

Fig. 7

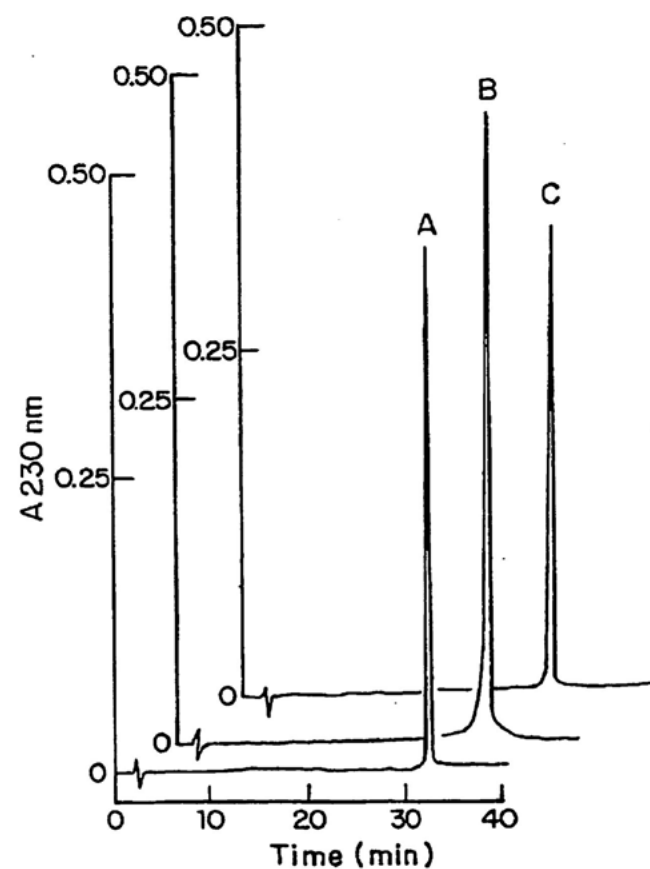


Fig. 8a

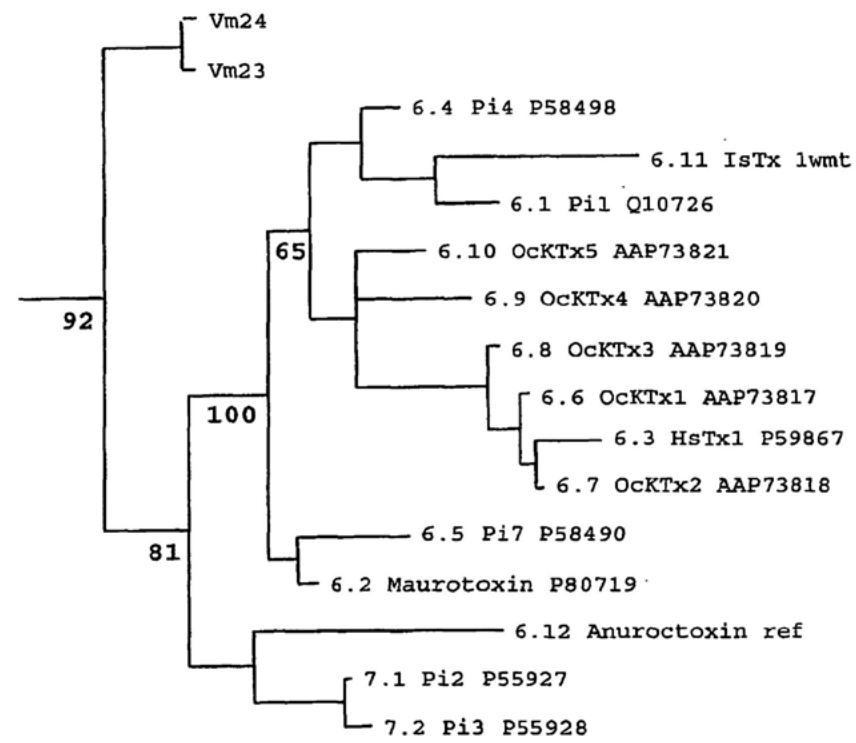
Multiple sequence alignment (CLUSTAL_X)

Name	Aligned sequences	%I
Vm24	AAAI SCVGSPECPPKCAQG -CKNGKCMNRKCKCYC ---	100
Vm23	AAAI SCVGS KECLPKCKAQG -CKSGKCMNKKCKCY -C---	83
6.1 Pi1 Q10726	---VKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKINRMCKCYGC ---	43
6.2 Maurotoxin P80719	---VSCITGSKDCYAPCRKQTGCPNA KCINKSCKCYGC ---	49
6.3 HsTx1 P59867	---ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC ---	46
6.4 Pi4 P58498	IEAIRCGGSRDCYRCPQKRTGCPNAKINKTCKCYGCS --	45
6.5 Pi7 P58490	DEAIRCTGTDKCYI PCRYITGCFNSRCINKSCKCYGCT --	42
6.6 OcKTx1 AAP73817	AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTCRNRC ---	46
6.7 OcKTx2 AAP73818	AEVIKCRTPKDCADPCRKQTGCPHGKCMNRTCRNRC ---	46
6.8 OcKTx3 AAP73819	AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHAKCMNKTCHRC ---	41
6.9 OcKTx4 AAP73820	AEIIRCSGTRECYAPCQKLTGCLNAKCMNKACKCYGCV --	47
6.10 OcKTx5 AAP73821	AEVIRCSGSKQCYGPCQQTGCTNSKCMN --CKCYGC---	51
6.12 Anuroctoxin P0C166	--QKECTGPQHCTNFCRKN -KTHGKCMNRKCKCFNCK --	46
6.13 spinoxin lv56	---IRCSGSRDCYSFCMKQTGCPNAKINKSCKCYGC ---	46
6.14 HgeTx1	-TGTSCISPQCTEPCRAKG -CKHGKCMNRKCHCMLCL --	51

EP 2 158 213 B1

Fig. 8b

Phylogenetic tree (MrBayes 3.0b4)



EP 2 158 213 B1

Fig. 9A

Kv1.3

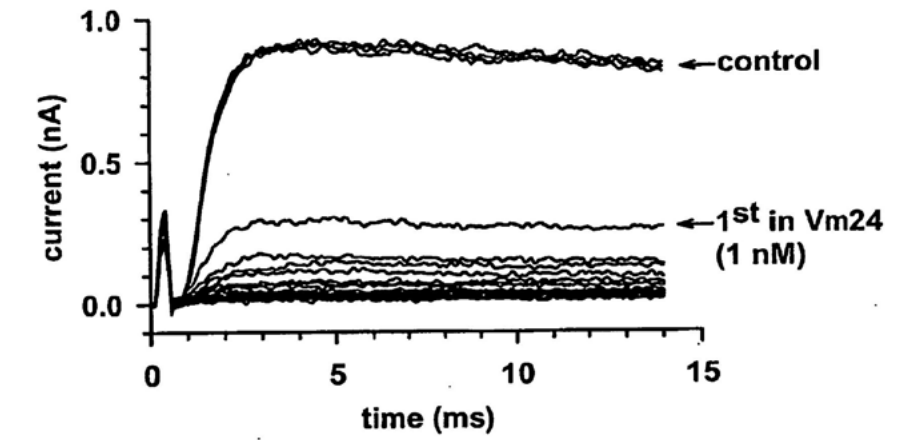
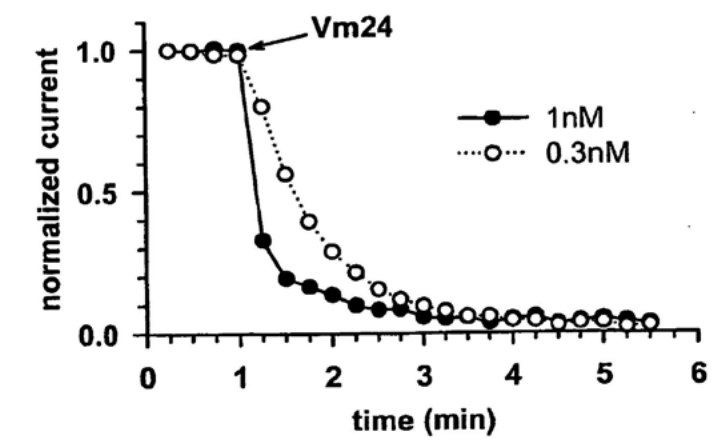


Fig. 9B

Kv1.3



EP 2 158 213 B1

Fig. 9C

Kv1.3

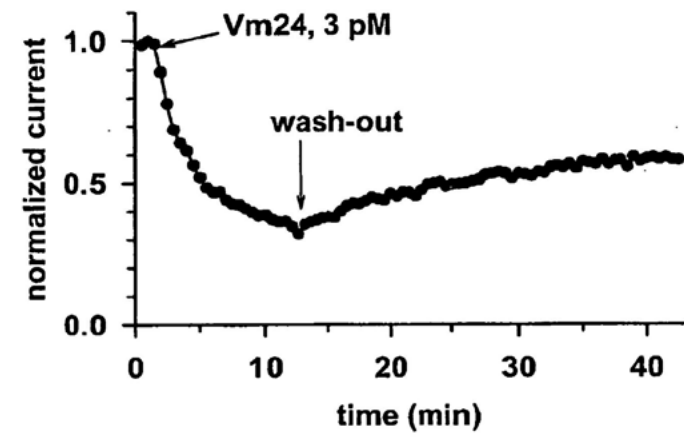
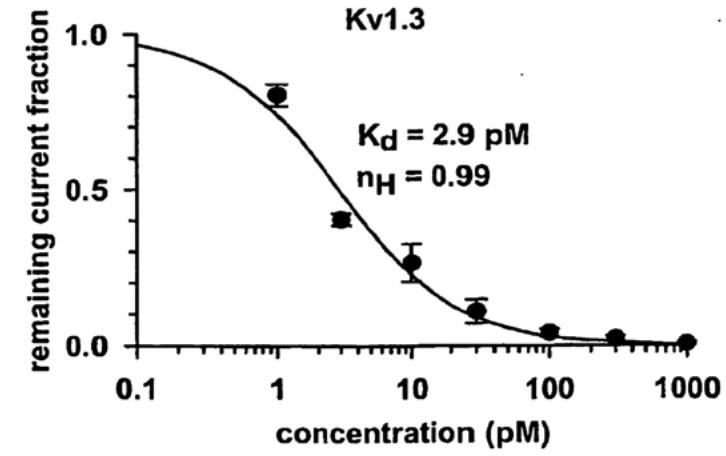


Fig. 9D

Kv1.3



53

EP 2 158 213 B1

Fig. 9E

IKCa1

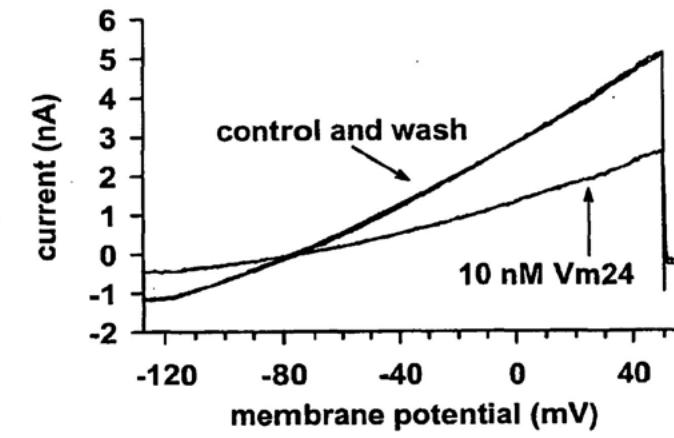
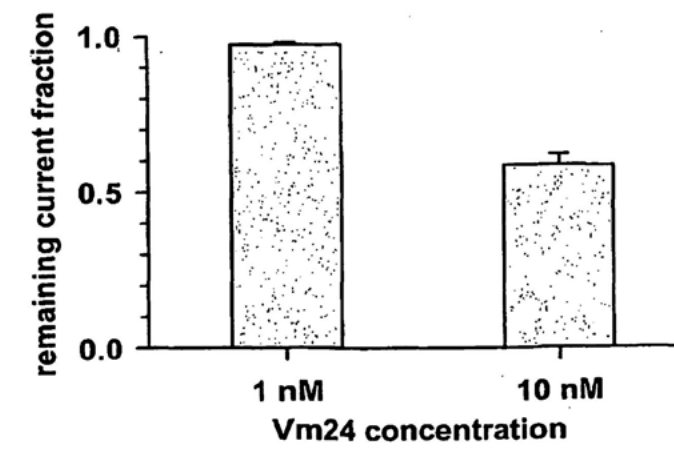


Fig. 9F

IKCa1



54

EP 2 158 213 B1

Fig. 10A

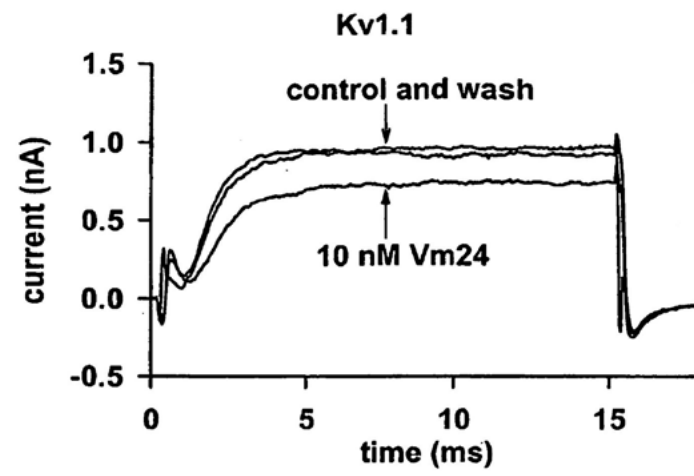
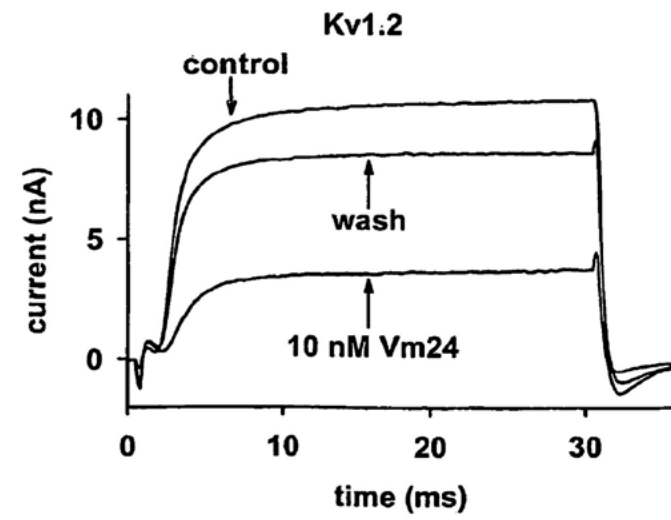


Fig. 10B



55

EP 2 158 213 B1

Fig. 10C

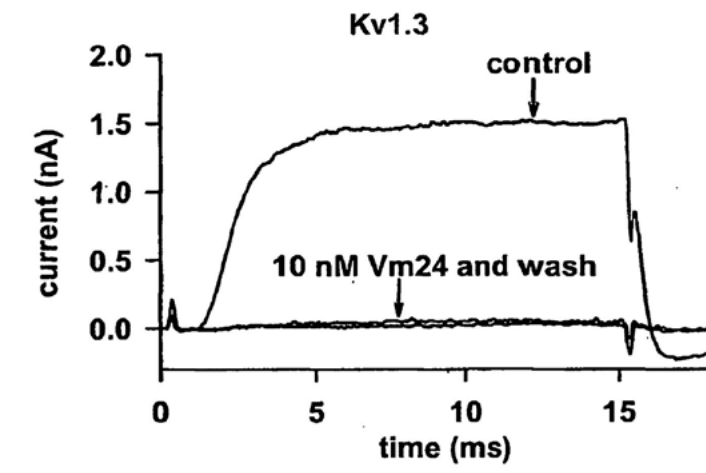
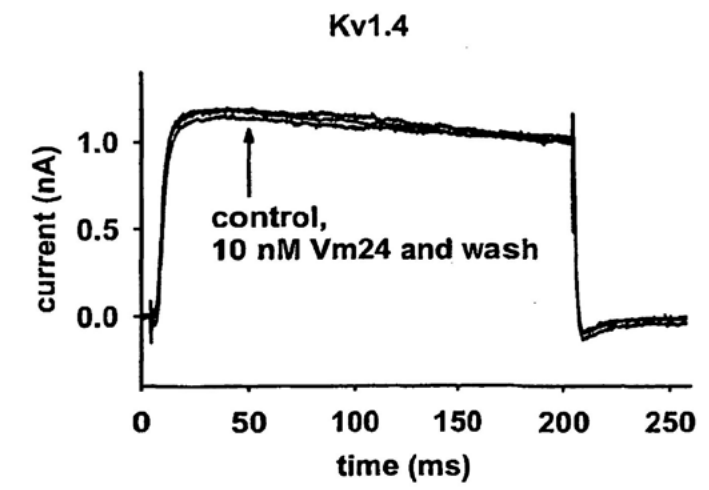


Fig. 10D

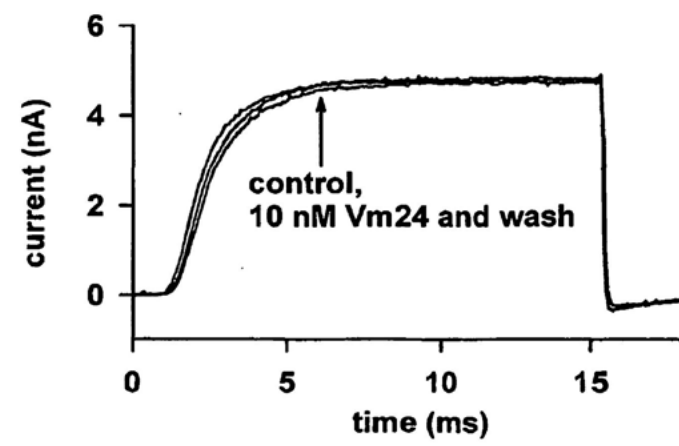


56

EP 2 158 213 B1

Fig. 10E

Kv1.5



57

EP 2 158 213 B1

Fig. 11A

Kv2.1

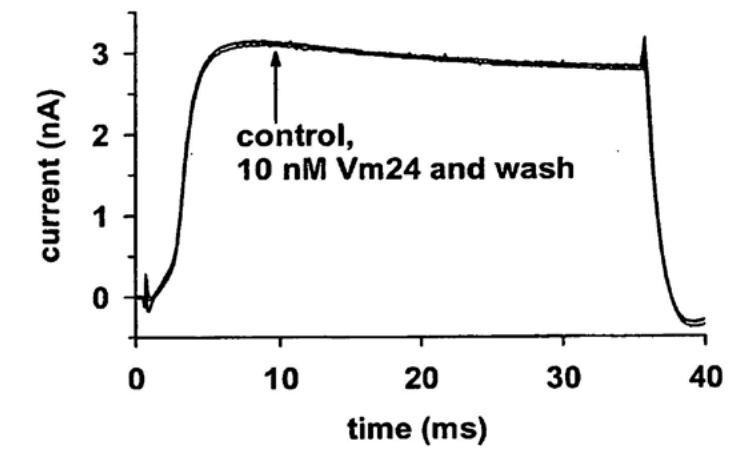
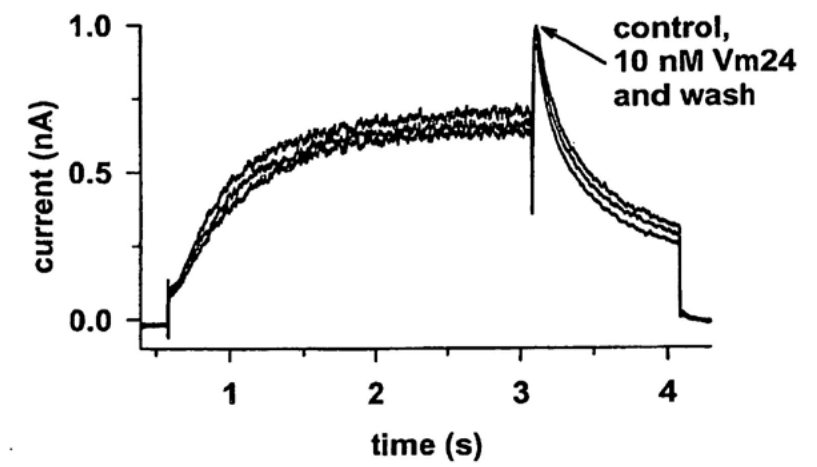


Fig. 11B

hERG



58

EP 2 158 213 B1

Fig. 11C

KCa1.1

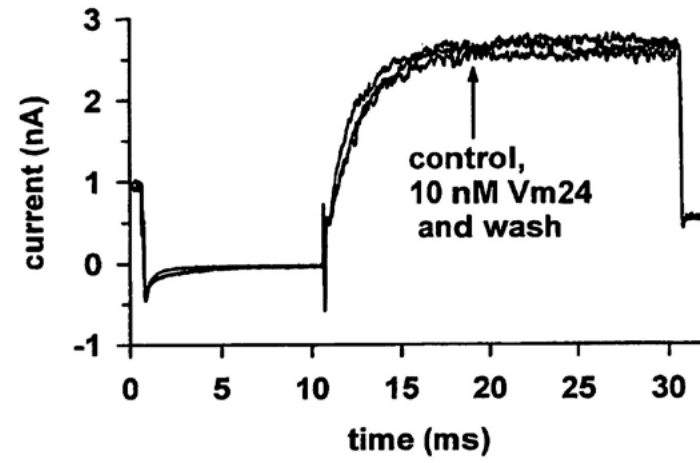
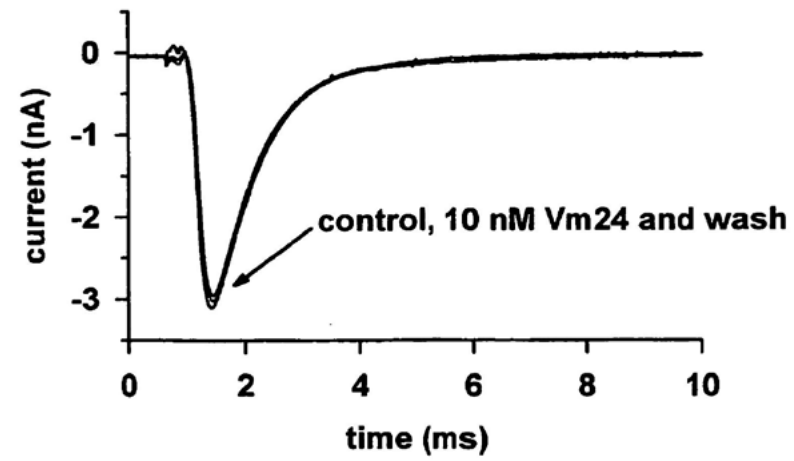


Fig. 11D

Na_v1.5



59

EP 2 158 213 B1

Fig. 12A

1 nM Vm24

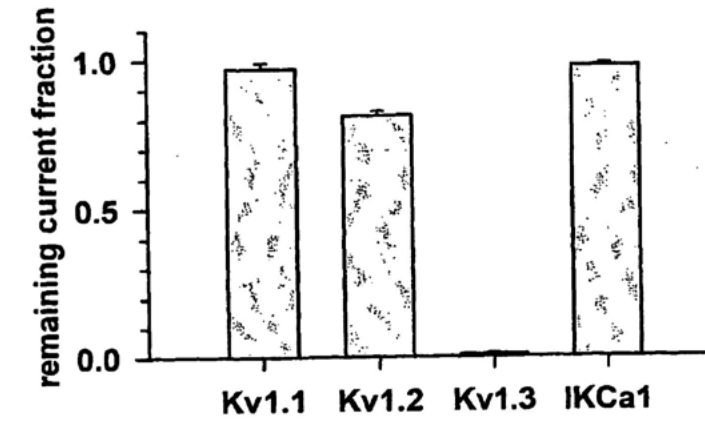
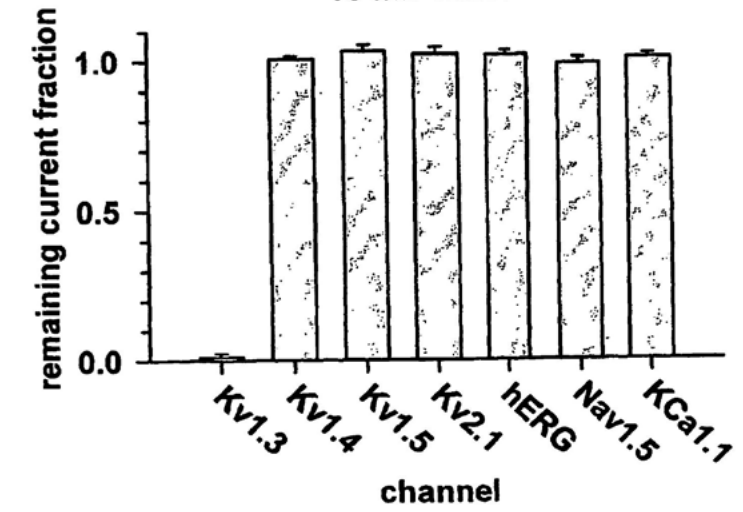


Fig. 12B

10 nM Vm24



60

EP 2 158 213 B1

Fig. 13A

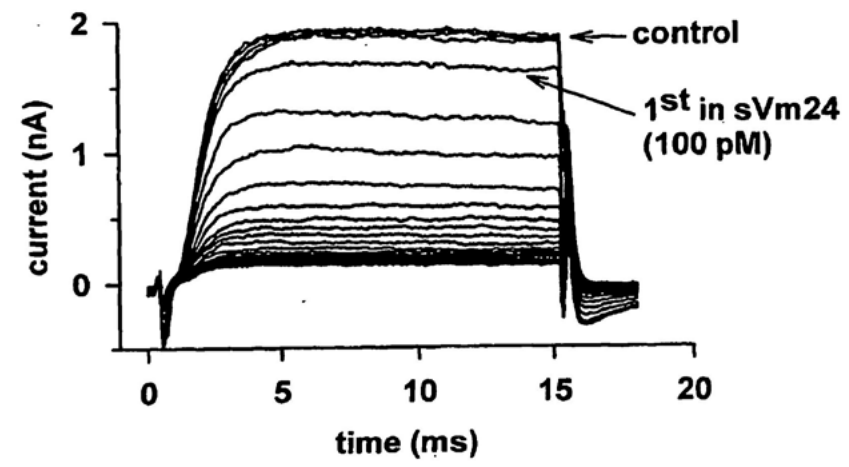
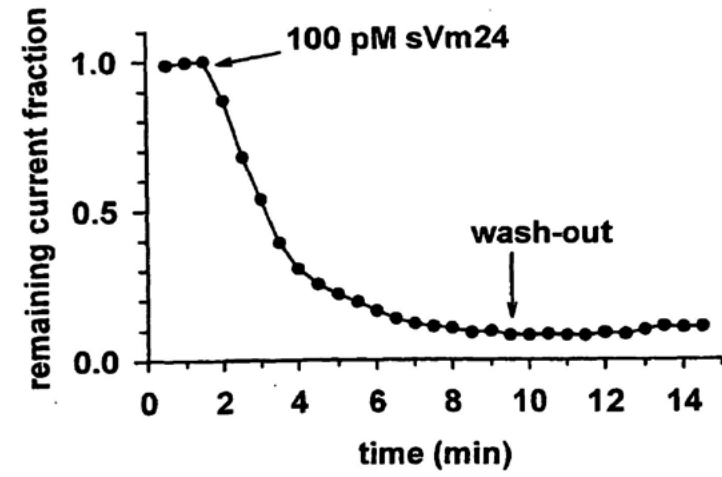
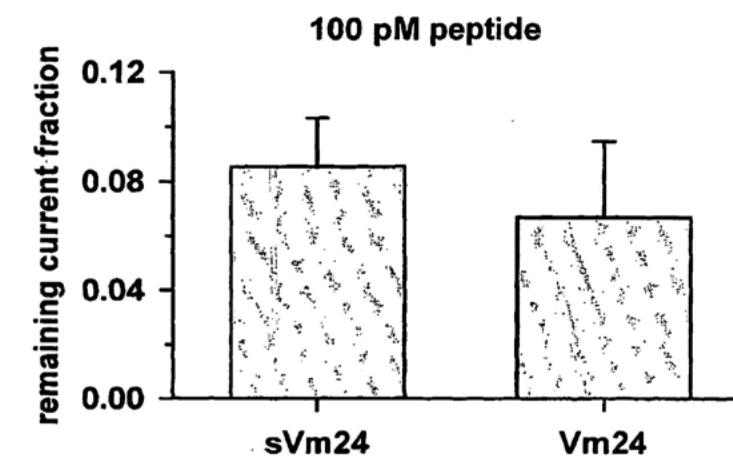


Fig. 13B



EP 2 158 213 B1

Fig. 13C



EP 2 158 213 B1

Fig. 14A

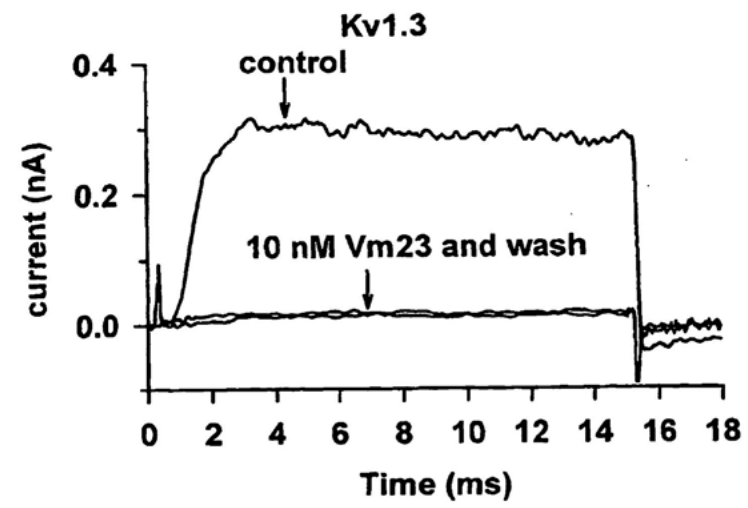
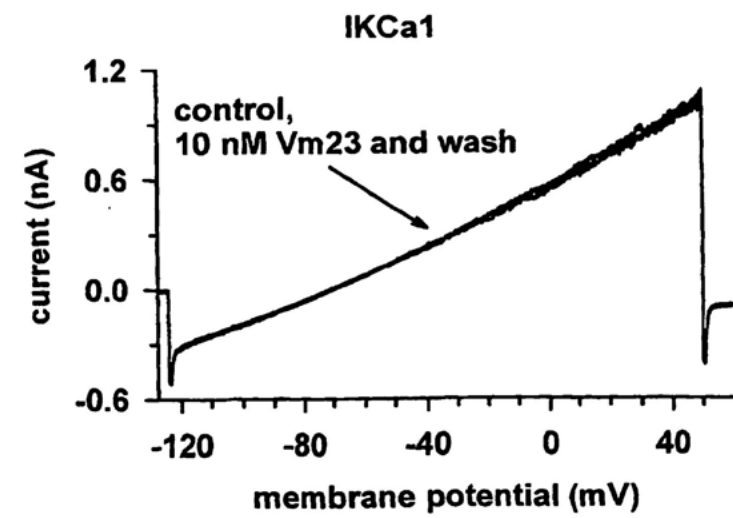


Fig. 14B



63

EP 2 158 213 B1

Fig. 14C

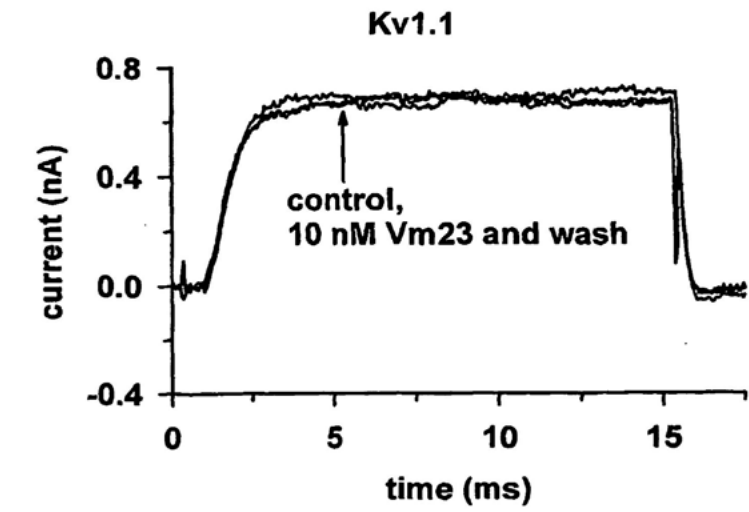
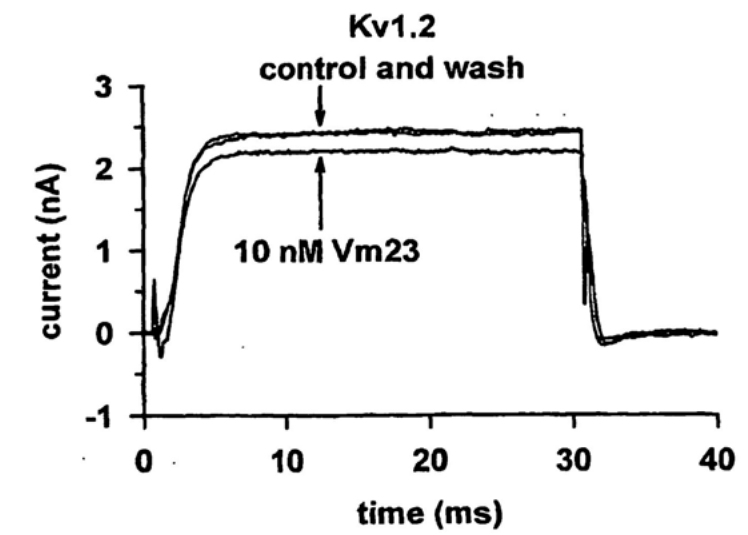


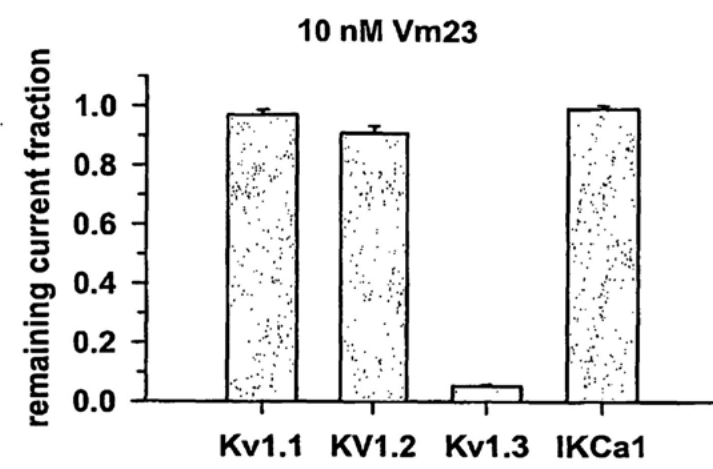
Fig. 14D



64

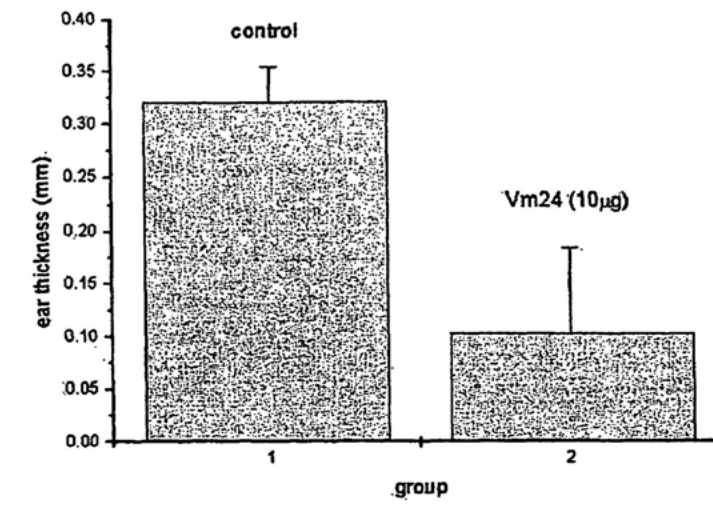
EP 2 158 213 B1

Fig. 15



EP 2 158 213 B1

Fig. 16



EP 2 158 213 B1

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

This list of references cited by the applicant is for the reader's convenience only. It does not form part of the European patent document. Even though great care has been taken in compiling the references, errors or omissions cannot be excluded and the EPO disclaims all liability in this regard.

Patent documents cited in the description

- US 5397702 A, Cahalan [0005]
- US 6077680 A, Kem [0005] [0007] [0058] [0066]
- WO 2006116156 A [0009]
- EP 0916681 A [0009]

Non-patent literature cited in the description

- BATISTA CESAR V F et al. *BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, vol. 1601 (2), 123-131 [0009]
- OLAMENDI-PORTUGAL et al. *TOXICON, ELMS-FORD*, 2005, vol. 46 (4), 418-419 [0009]
- REMYNTOON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Mack Publishing Co, 1995 [0037]
- Aebersold R ; Goodlett DR. Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem. Rev.*, 2001, vol. 101, 269-95 [0148]
- Ahem CA ; Zhang, JF ; Wookalis MJ ; Horn R. Modulation of the cardiac sodium channel NaV1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circ Res*, 2005, vol. 96, 991-8 [0148]
- Hanson DC ; Simon M ; Dethlefs B ; Lee C-L ; Hell JE ; Gutman GA ; Chandy KG. Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron*, 1995, vol. 15, 1169-81 [0148]
- Alessandri-Haber N ; Lecoq A ; Gasparini S ; Grangier-Macmath G ; Jacquet G ; Harvey AL ; de Medeiros C ; Rowan EG ; Gola M ; Menez A. Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3. Clues to design analogs with enhanced selectivity. *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, 35653-61 [0148]
- Altschul SF ; Gish W ; Miller W ; Myers EW ; Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, vol. 215, 403-10 [0148]
- Aneiros A ; Garcia I ; Martinez JR ; Harvey AL ; Anderson AJ ; Marshall DL ; Engstrom A ; Hellman U ; Karlsson E. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim Biophys Acta*, 1993, vol. 1157, 86-92 [0148]
- Auguste P ; Hugues M ; Grave B ; Gesquiere JC ; Maes P ; Tartar A ; Romey G ; Schweitz H ; Lazdunski M. Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. *J Biol Chem*, 1990, vol. 265, 4753-9 [0148]
- Avdonin V ; Tang XD ; Hoshi T. Stimulatory action of internal protons on Slol BK channels. *Biophys J*, 2003, vol. 84, 2969-80 [0148]
- Bagdany M ; Batista CV ; Valdez-Cruz NA ; Somodi S ; Rodriguez de la Vega RC ; Licea AF ; Varga Z ; Gaspar R ; Possani LD ; Panyi G. Anurotoxin, a new scorpion toxin of the α -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol Pharmacol*, 2005, vol. 67, 1034-44 [0148]
- Batista CV ; Roman-Gonzalez SA ; Salas-Castillo SP ; Zamudio FZ ; Gomez-Lagunas F ; Possani LD. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2007 [0148]
- Beeton C ; Wulff H ; Barbaria J ; Clot-Faybesse O ; Pennington M ; Bernard D ; Cahalan MD ; Chandy KG ; Beraud E. Selective blockade of T lymphocyte K⁽⁺⁾ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, vol. 98, 13942-7 [0148]
- Beeton C ; Chandy KG. Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis. *Neuroscientist*, 2005, vol. 11, 550-62 [0148]
- Beeton C ; Pennington MW ; Wulff H ; Singh S ; Nugent D ; Crossley G ; Khaytin I ; Calabresi PA ; Chen CY ; Gutman GA. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol*, 2005, vol. 67, 1369-81 [0148]
- Beeton C ; Wulff H ; Standifer NE ; Azam P ; Mullen KM ; Pennington MW ; Kolski-Andreaco A ; Wei E ; Grino A ; Counts DR. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, vol. 103, 17414-9 [0148]
- Carbone E ; Wanke E ; Prestipino G ; Possani LD ; Maelicke A. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, 1982, vol. 296, 90-1 [0148]

EP 2 158 213 B1

- Engstrom A ; Wernstedt C ; Karlsson E. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 1995, vol. 33, 603-13 [0148]
- Castle NA ; Haylett DG ; Jenkinson DH. Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci*, 1989, vol. 12, 59-65 [0148]
- Chandy KG ; Wulff H ; Beeton C ; Pennington M ; Gutman GA ; Cahalan MD. K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, vol. 25, 280-9 [0148]
- Cooper N ; Bussell J. The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2006, vol. 133, 364-74 [0148]
- Corcione A ; Casazza S ; Ferretti E ; Giunti D ; Zappia E ; Pistorio A ; Gambini C ; Mancardi GL ; Uccelli A ; Pistoia V. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, 11064-9 [0148]
- Crest M ; Jacquet G ; Gola M ; Zerrouk H ; Benslimane A ; Rochat H ; Mansuelle P ; Martin-Eauclaire MF. Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J Biol Chem*, 1995, vol. 267, 1640-7 [0148]
- Deutsch C ; D Krause ; SC Lee. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J Physiol (Lond)*, 1995, vol. 372, 405-23 [0148]
- Diego-Garcia E ; Schwartz EF ; D'Suze G ; Gonzalez SA ; Batista CV ; Garcia BI ; Rodriguez de la Vega RC ; Possani LD. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides*, 2007, vol. 28, 31-7 [0148]
- Doyle DA ; CJ Morais ; RA Pfuetzner ; A Kuo ; M Gulbis ; SL Cohen ; BT Chait ; R MacKinnon. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 1998, vol. 280, 69-77 [0148]
- Drakopoulou E ; Cotton J ; Virelizier H ; Bernardi E ; Schools AR ; Partiseti M ; Choquet D ; Gurrola G ; Possani LD ; Vita C. Chemical synthesis, structural and functional characterisation of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage-dependent K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, vol. 213, 901-7 [0148]
- Fanger CM ; H Rauer ; Neben AL ; Miller MJ ; Wulff H ; Rosa JC ; Ganellin CR ; Chandy KG ; Cahalan MD. Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 12249-56 [0148]
- Feng J ; Wible B ; Li GR ; Wang Z ; Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res*, 1997, vol. 80, 572-79 [0148]
- Galvez A ; Gimenez-Gallego G ; Reuben JP ; Roy-Contancin L ; Feigenbaum P ; Kaczorowski GJ ; Garcia ML. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem*, 1990, vol. 265, 11083-90 [0148]
- Garcia ML ; Garcia-Calvo M ; Hidalgo P ; Lee A ; MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 6834-9 [0148]
- Garcia ML ; Gao Y ; McManus OB ; Kaczorowski GJ. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon*, 2001, vol. 39, 739-48 [0148]
- Garcia-Calvo M ; Leonard RJ ; Novick J ; Stevens SP ; Schmalhofer W ; Kaczorowski GJ ; Garcia ML. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, 18866-74 [0148]
- Giangiacoamo KM ; Ceralde Y ; Mullmann TJ. Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon*, 2004, vol. 43, 877-86 [0148]
- Ghanshani S ; Wulff H ; Miller MJ ; Rohm H ; Neben A ; Gutman GA ; Cahalan MD ; Chandy KG. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, 37137-49 [0148]
- Goldstein SA ; Miller C. Mechanism of Charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys J*, 1993, vol. 65, 1613-1619 [0148]
- Goldstein SA ; Pheasant DJ ; Miller C. The Charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron*, 1994, vol. 12, 1377-88 [0148]
- Gutman GA ; Chandy KG ; Grissmer S ; Lazdunski M ; MacKinnon D ; Pardo LA ; Robertson GA ; Rudy B ; Sanguinetti MC ; Stuhmer W. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 2005, vol. 57, 473-508 [0148]
- Grissmer S ; Dethlefs B ; Wasmuth JJ ; Goldin AL ; Gutman GA ; Cahalan MD ; Chandy KG. Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, vol. 87, 9411-5 [0148]

EP 2 158 213 B1

- **Grissmer S ; Nguyen AN ; Aiyar J ; Hanson DC ; Mather RJ ; Gutman GA ; Karmilowicz MJ ; Au-perin DD ; Chandy KG.** Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol*, 1994, vol. 45, 1227-34 [0148]
- **Grissmer S ; Nguyen AN ; Cahalan MD.** Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, pharmacology. *J Gen Physiol*, 1993, vol. 102, 601-30 [0148]
- **Harvey AL.** Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen Pharmacol*, 1997, vol. 28, 7-12 [0148]
- **Hidalgo P ; MacKinnon R.** Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science*, 1995, vol. 268, 307-10 [0148]
- **Huelsenbeck JP ; Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 2001, vol. 17, 754-5 [0148]
- **Iglesias A ; Bauer J ; Litzzenburger T ; Schubart A ; Linington C.** T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia*, 2001, vol. 36, 220-34 [0148]
- **Immke D ; Wood M ; Kiss L ; Korn SJ.** Potassium-dependent changes in the conformation of the Kv2.1 potassium channel pore. *J Gen Physiol*, 1999, vol. 113, 819-36 [0148]
- **McDonnell JM ; Marini JC ; Korngold R.** A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Nature*, 1994, vol. 368, 744-6 [0148]
- **Janeway CA ; Travers P ; Walport M ; Shlomchik MJ.** Immunobiology. Garland Publishing, 2001, 187-220 [0148]
- **Jouirou B ; Mouhat S ; Andreotti N ; De Waard M ; Sabatier JM.** Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon*, 2004, vol. 43, 909-14 [0148]
- **Judge SI ; Bever CT Jr.** Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol Ther*, 2006, vol. 111, 224-59 [0148]
- **Juvvadi P ; Vunnam S ; Merrifield RB.** Synthetic melittin, its enantio, retro, and retroenantio isomers, and selected chimeric analogs: their antibacterial, hemolytic, and lipid bilayer action. *J Am Chem Soc*, 1996, vol. 118, 8989-97 [0148]
- **Kalman K ; MW Pennington ; Lanigan MD ; Nguyen A ; Rauer H ; Mahnir V ; Paschetto K ; Kem WR ; Grissmer S ; Gutman GA.** ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 32697-707 [0148]
- **Koch RO ; Wanner SG ; Koschak A ; Hanner M ; Schwarzer C ; Kaczorowski GJ ; Slaughter RS ; Garcia ML ; Knaus HG.** *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, 27577-81 [0148]
- **Koo GC ; Blake JT ; Talento A ; Nguyen M ; Lin S ; Sirotina A ; Shah K ; Mulvany K ; Hora D Jr ; Cunningham P.** Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol*, 1997, vol. 158, 5120-8 [0148]
- **Krezel AM ; Kasibhatla C ; Hidalgo P ; MacKinnon R ; Wagner G.** Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Sci*, 1995, vol. 4, 1478-89 [0148]
- **Kurata HT ; Wang Z ; Fedida D.** NH2-terminal inactivation peptide binding to C-type-inactivated Kv channels. *J Gen Physiol*, 2004, vol. 123, 505-20 [0148]
- **Lebrun B ; Romi-Lebrun R ; Martin-Eauclaire MF ; Yasuda A ; Ishiguro M ; Oyama Y ; Pongs O ; Nakajima T.** A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K⁺ channels, isolated from Heterometrus spinnifer (Scorpionidae) venom. *Biochem J*, 1997, vol. 328, 321-7 [0148]
- *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, vol. 102, 15441-6 [0148]
- **Lerner EC ; Qian Y ; Blaskovich MA ; Fossum RD ; Vogt A ; Sun J ; Cox AD ; Der CJ ; Hamilton AD ; Sebt SM.** Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem*, 1995, vol. 270, 26802-6 [0148]
- **Lewis RS ; Cahalan MD.** Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 1995, vol. 13, 623-53 [0148]
- **Lewis RS.** Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 2001, vol. 19, 497-521 [0148]
- **Long SB ; Campbell EB ; Mackinnon R.** Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*, 2005, vol. 309, 897-903 [0148]
- **Matteson DR ; Deutsch C.** K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature*, 1984, vol. 307, 468-71 [0148]
- **Merrifield RB.** Solid-phase peptide synthesis. 2. An improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry*, 1964, vol. 3, 1385-90 [0148]
- **Miller C ; Moczydlowski E ; Latorre R ; Phillips M.** Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*, 1985, vol. 313, 316-8 [0148]
- **Mouhat S ; Jouirou B ; Mosbah A ; De Waard M ; Sabatier JM.** Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J*, 2004, vol. 378, 717-26 [0148]

EP 2 158 213 B1

- **Moczydlowski E.** Chemical basis for alkali cation selectivity in potassium-channel proteins. *Chem Biol*, 1985, vol. 5, R291-301 [0148]
- **O'Connor K ; Bar-Or A ; Hafler DA.** The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol*, 2001, vol. 21, 81-92 [0148]
- **O'Leary ME ; Chen LQ ; Kallen RG ; Horn R.** A molecular link between activation and inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol*, 1995, vol. 106, 641-58 [0148]
- **Oren H ; Ozkal S ; Gulen H ; Duman M ; Ucar C ; Atabay B ; Yilmaz S ; Kargi A ; Irken G.** Autoimmune lymphoproliferative syndrome: report of two cases and review of the literature. *Ann Hematol*, 2002, vol. 81, 651-3 [0148]
- **Orengo CA ; Thornton JM.** Protein families and their evolution—a structural perspective. *Annu Rev Biochem*, 2005, vol. 74, 867-900 [0148]
- **Panyi G ; Varga Z ; Gaspar R.** Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett*, 2004, vol. 92, 55-66 [0148]
- **Panyi G ; Possani LD ; Rodriguez de la Vega RC ; Vaiga Z.** K⁺ channel blockers: Novel Tools to Inhibit T cell Activation leading to specific immunosuppression. *Curr Pharm Des*, 2006, vol. 12, 2199-2220 [0148]
- **Park CS ; Miller C.** Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 7749-55 [0148]
- **Patel SP ; Campbell DL.** Transient outward potassium current, 'I_{to}', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol*, 2005, vol. 569, 7-39 [0148]
- **Pearson WR ; Lipman DJ.** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 2444-8 [0148]
- **Pennington MW ; Byrnes ME ; Zaydenberg I ; Khaytin I ; de Chastonay J ; Krafte DS ; Hill R ; Mahnir VM ; Volberg WA ; Gorczyca W.** Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Int J Pept Protein Res*, 1995, vol. 46, 354-8 [0148]
- **Peter J ; Varga Z ; Hajdu P ; Gaspar RJ ; Damjanovich S ; Horjales E ; Possani LD ; Panyi G.** Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol*, 2001, vol. 179, 13-25 [0148]
- **Phanuphak P ; Moorhead JW ; Claman HN.** Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. I. In vivo detection by ear swelling and correlation with in vitro cell stimulation. *J Immunol*, 1974, vol. 112, 115-23 [0148]
- *Biochem J*, vol. 229, 739-50 [0148]
- **Possani LD ; Becerril B ; Delepierre M ; Tytgat J.** Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem*, 1999, vol. 264, 287-300 [0148]
- **Scorpion venom peptides. Possani LD ; Rodriguez de la Vega RC.** Handbook of biologically active peptides. Academic Press, 2006, 339-354 [0148]
- **Rogart RB ; Cribbs L ; Muglia LK ; Kephart DD ; Kaiser MW.** Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, vol. 86, 8170-4 [0148]
- **Ronquist F ; Huelsenbeck JP.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, vol. 19, 1572-4 [0148]
- **Rauer H ; Lanigan MD ; Pennington MW ; Aiyar J ; Ghanshani S ; Cahalan MD ; Norton RS ; Chandy KG.** Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, 1201-8 [0148]
- **Rodriguez de la Vega RC ; Merino E ; Becerril B ; Possani LD.** Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, vol. 24, 222-7 [0148]
- **Rodriguez de la Vega RC ; Possani LD.** Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon*, 2004, vol. 43, 865-75 [0148]
- **Sallusto F ; Lenig D ; Forster R ; Lipp M ; Lanzavecchia A.** Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, vol. 401, 708-12 [0148]
- **Sallusto F ; Geginat J ; Lanzavecchia A.** Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, maintenance. *Annu Rev Immunol*, 2004, vol. 22, 745-63 [0148]
- **Sanguinetti MC ; Tristani-Firouzi M.** hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, 2006, vol. 440, 463-9 [0148]
- **Sarin VK ; Kent SBH ; Tam JP ; Merrifield BR.** Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem*, 1981, vol. 117, 147-57 [0148]
- **Soler D ; Humphreys TL ; Spinola SM ; Campbell JJ.** CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood*, 2003, vol. 101, 1677-82 [0148]
- **Stampe P ; Kolmakova-Partensky L ; Miller C.** Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 443-50 [0148]
- **Strong PN.** Potassium channel toxins. *Pharmacol Ther*, 1990, vol. 46, 137-62 [0148]
- **Sugg EE ; Garcia ML ; Reuben JP ; Patchett AA ; Kaczorowski GJ.** Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel. *J Biol Chem*, 1990, vol. 265, 18745-8 [0148]

EP 2 158 213 B1

- **Thompson JD ; Gibson TJ ; Plewniak F ; Jeanmougin F ; Higgins DG.** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25, 4876-82 [0148]
- **Thornton JW ; DeSalle R.** Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2000, vol. 1, 41-73 [0148]
- **Tytgat J ; Chandy KG ; Garcia ML ; Gutman GA ; Martin-Eauclaire MF ; van der Walt JJ ; Possani LD.** A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, vol. 20, 444-7 [0148]
- **Valdez-Cruz NA ; Batista CV ; Possani LD.** Phalloidin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phalloidus*. *Eur J Biochem*, 2004, vol. 271, 1453-64 [0148]
- **Valverde P ; Kawai T ; Taubman MA.** Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res*, 2004, vol. 19, 155-64 [0148]
- **Vennekamp J ; Wulff H ; Beeton C ; Calabresi PA ; Grissmer S ; Hansel W ; Chandy KG.** Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxy-psoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol*, 2004, vol. 65, 1364-1374 [0148]
- **Viglietta V ; Kent SC ; Orban T ; Hafner DA.** GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest*, 2002, vol. 109, 895-903 [0148]
- **Visan V ; Fajloun Z ; Sabatier JM ; Grissmer S.** Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1.2, hKv1.3, hKv1.4 channels. *Mol Pharmacol*, 2004, vol. 66, 1103-12 [0148]
- **Wei AD ; Gutman GA ; Aldrich R ; Chandy KG ; Grissmer S ; Wulff H.** International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 2005, vol. 57, 463-472 [0148]
- **Wulff H ; Gutman GA ; Cahalan MD ; Chandy KG.** Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 32040-5 [0148]
- **Wulff H ; Calabresi PA ; Allie R ; Yun S ; Pennington M ; Beeton C ; Chandy KG.** The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest*, 2003, vol. 111, 1703-13 [0148]
- **Wulff H ; Knaus HG ; Pennington M ; Chandy KG.** K+ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol*, 2004, vol. 173, 776-86 [0148]
- **Yamashita K ; Choi U ; Woltz PC ; Foster S ; Snelker MC ; Hakim FT ; Fowler DH.** Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4+ effector memory cells relative to central memory cells. *Blood*, 2004, vol. 103, 3986-8 [0148]
- **Zamudio FZ ; Saavedra R ; Martin BM ; Gurrola-Briones G ; Herion P ; Possani LD.** Amino acid sequence an immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem*, 1992, vol. 204, 281-92 [0148]
- **Zamudio FZ ; Conde R ; Arevalo C ; Becerril B ; Martin BM ; Valdivia HH ; Possani LD.** The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, 11886-94 [0148]
- **Zhu S ; Huys I ; Dyason K ; Verdonck F ; Tytgat J.** Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. *Proteins*, vol. 54, 361-70 [0148]
- **Zweifach A ; Lewis RS.** Mitogen-regulated Ca2+ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca2+ stores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, vol. 90, 6295-99 [0148]



ANÁLISIS COMPARATIVO DEL OTORGAMIENTO DE UNA MISMA PATENTE BIOTECNOLÓGICA EN DIFERENTES PAÍSES

Mario Trejo Loyo y Martín Patiño Vera, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. 62210, mtrejo@ibt.unam.mx.

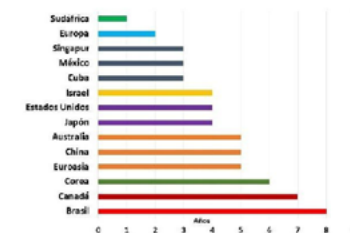
Palabras clave: Patentes, Biotecnología, Comercialización.

Introducción. La protección por patente es una herramienta fundamental para el licenciamiento y explotación comercial de invenciones en diferentes áreas, particularmente en biotecnología para la salud. En un mundo globalizado es importante considerar dicha explotación en los diversos países y/o regiones y por lo tanto su debida protección. El presente trabajo aborda un caso donde se otorgó una licencia mundial sobre un bio-fármaco, la estrategia de redacción y gestión de las patentes y las diferencias principales entre los elementos de protección que otorgaron los principales países/regiones, así como los tiempos y principales costos.

Metodología. Estudio de caso.

Resultados. La invención consiste en 2 péptidos (con una homología del 83 %) aislados del veneno de un alacrán morelense que, tras su detallado estudio electrofisiológico, demostraron ser eficaces y altamente específicos bloqueadores del canal de potasio Kv1.3, que está identificado como el *target* principal para el desarrollo de tratamientos contra enfermedades autoinmunes y rechazo de órganos. Para la redacción de la solicitud de patente se generó una secuencia consenso y se redactaron reivindicaciones para las siguientes materias sujetas de patente (M) (Ver Tabla 1): un péptido que tuviese dicha secuencia, particularmente los péptidos aislados^{M1} y homólogos^{M2}; una composición farmacéutica que los contuviese solos o combinados con otros inmunosupresores^{M4}; métodos para: el tratamiento de pacientes con una enfermedad autoinmune o rechazo de órganos^{M3}, bloquear el canal de potasio en células de mamífero^{M5}, bloquear la vía de señalización de calcio en linfocitos T^{M6}, suprimir el proceso de activación de tales células^{M7}, suprimir respuesta inmune^{M8}, diagnóstico^{M10} y, finalmente, el péptido marcado^{M9}.

Contando ya con un socio comercial (empresa europea) ésta financió la entrada en fase nacional en 16 países o regiones, incluyendo México, Europa y los EEUU, con un costo cercano a los \$92,000 dólares.



La Figura 1 muestra los diferentes tiempos de otorgamiento de cada país/región, siendo el más rápido en analizar y otorgar, Europa. México quedó entre los más rápidos.

Fig. 1 Tiempo de cada país para otorgar la patente, desde la entrada en fase nacional

La solicitud inicial (prioridad) fue una solicitud internacional (coloquialmente: PCT) que fue redactada y gestionada en el propio IBt. El manejo de las fases nacionales fue dirigido entre el IBt y la empresa licenciataria, mediante un despacho de patentes mexicano, que coordinó la interacción con cada oficina de patente de los respectivos países o regiones.

En cuanto a la materia sujeta de patente, cada país en su legislación tiene ciertas limitaciones a lo que se puede otorgar o no en una protección por patente. Por ejemplo, en México no se otorgan patentes de métodos de tratamiento o diagnóstico *in vivo*. En este sentido, las jurisdicciones de Europa y Estados Unidos sirven de guía a la mayoría de los países.

La Tabla 1 muestra un análisis comparativo de las materias sujetas de patente que fueron otorgadas por Europa, Estados Unidos y México.

Tabla 1. Materias (M) solicitadas en PCT y otorgadas por país/región.

PCT	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
USA	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EP	✓	✓	x	✓	✓	✓	UU	✓	✓	✓
MX	✓	✓	x	✓	✓	UU	✓	UU	✓	✓

UU= Uso del péptido conforme al método en lugar del método mismo.

Conclusiones. En un mundo globalizado, es indispensable que las solicitudes de patente sean redactadas teniendo en cuenta las limitaciones legales de los países/regiones seleccionados, en cada una de las materias que se quiera proteger de una misma invención. Los costos de cobertura global de patente son prohibitivos para una institución académica nacional, por lo que es muy recomendable iniciar los esfuerzos de licenciamiento tan pronto se haya registrado la solicitud de patente inicial, sin esperar a su otorgamiento, que puede tardar hasta ocho años o más (mientras que la vigencia de patente es de solo 20 años, desde la fecha de la primera presentación).

Agradecimiento. Se agradece el apoyo legal de la Dirección General de Asuntos Jurídicos/UNAM y financiero de la Coordinación de Innovación y Desarrollo/UNAM.

Bibliografía. Solicitud WO2008/139243A1 y Patentes EP2158213; US839477 y MX298891. M. Trejo L. y M. Patiño V. (2016). Obtiene el IBt cinco nuevas patentes en 2015. *Biotecnología en Movimiento* No. 4, Enero-Febrero-Marzo, páginas 16-17.

PROPIEDAD INTELECTUAL, TECNOLOGÍA Y EMPRESA

Sección a cargo de Carlos Peña Malacara (carlosf@ibt.unam.mx)

El IBt tiene una muy importante capacidad de generación de conocimiento y una parte de él tiene el potencial de ser explotado comercialmente, para lo que requiere de la protección de los derechos de propiedad intelectual. La propiedad intelectual es un elemento fundamental de la innovación y nuestro Instituto es la entidad académica de la UNAM que más patentes genera. Por otro lado, la formación de empresas de base tecnológica continúa siendo un tema pendiente en nuestro país. Específicamente en el caso de la Biotecnología, la brecha es muy amplia, con los países desarrollados.

Aunque cada vez son más los programas que apoyan este tipo de acciones, estamos lejos de alcanzar los niveles que, como país, requerimos para un desarrollo competitivo. Esta sección pretende compartir con nuestros lectores diversas experiencias tanto del IBt como de otras instancias nacionales e internacionales orientadas al emprendimiento de base científica, desde la creación de nuevas empresas en diferentes campos de la biotecnología, así como la protección intelectual del conocimiento generado.

Raúl Rojas



10 BIOTECNOLOGÍA EN MOVIMIENTO

Experiencia del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba en la protección por patentes de sus resultados

Máster en C. Mariela Vázquez Castillo



El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se considera la institución insigne del desarrollo de la biotecnología en Cuba y cuenta con una alta capacidad científico-técnica. Es una institución con un esquema de ciclo cerrado, que incluye la investigación, desarrollo, la producción y la comercialización de productos de la biotecnología, tanto en la esfera de la bio-medicina, como en la agropecuaria. Fue inaugurado el 1ro de julio de 1986, pero el grupo fundador inició sus labores de investigación en el año 1981, logrando en ese mismo año, su primer producto, el Interferón leucocitario. Actualmente, el producto líder es el Heberprot-P®, un medicamento cuya aplicación oportuna en las úlceras del pie

BIOTECNOLOGÍA EN MOVIMIENTO 11



Raúl Rojas

diabético, evita la amputación. El CIGB ha generado 12 productos, entre medicamentos y vacunas para uso humano, 4 kits de diagnóstico y 3 productos de la línea agropecuaria.

Forman parte del CIGB otras dos instituciones ubicadas en el centro del país, una de ellas en Camagüey, la cual se dedica fundamentalmente a la investigación y producción de productos relacionados con la esfera agro-

pecuaria y la otra en la provincia de Sancti Spiritus, dedicada a la investigación y desarrollo de sistemas de diagnóstico. En total, el CIGB cuenta con cerca de 1500 trabajadores, de los cuales 407 son Doctores y Másteres en Ciencias. Posee amplio soporte tecnológico para el trabajo con proteínas recombinantes, polisacáridos sintéticos, péptidos, vectores de ADN y virales, fragmentos de anticuerpos recombinantes, genómica, proteómica y bioinformática.

Las plantas de producción mantienen los estándares internacionales de Buenas Prácticas de Fabricación y están certificadas por la autoridad regulatoria cubana, el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED).

El presente trabajo expone la experiencia del CIGB en la protección de sus resultados novedosos de Investigación y Desarrollo (I+D), como herramienta útil para la negociación de sus proyectos o la comercialización exitosa de sus productos.

Marco legislativo

Desde finales de los años 80, la biotecnología como ciencia ha ido aumentando su papel en la salud humana y animal, la alimentación y la preservación del medio ambiente. A partir del 1 de Enero de 1995, con el surgimiento de la Organización Mundial del Comercio (OMC) y sus acuerdos vinculantes, entre ellos el Acuerdo sobre los Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio (ADPIC) [1], todos sus miembros deben conceder protección por patente, por no menos de 20 años contados desde su solicitud, para todas las invenciones en cualquier campo de la tecnología, que cumplan con los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial. En tales circunstancias, el número de patentes relacionadas con la industria farmacéutica y la biotecnología ha aumentado significativamente.

El carácter proteccionista de la legislación de patentes en Cuba según el Decreto-Ley 68 [2], vigente hasta el 2012, jugó un papel importante en el desarrollo que el país ostenta hoy en la esfera de la biotecnología y la industria farmacéutica. Esto hubiera sido imposible en el contexto actual.

No obstante, si bien ADPIC [1] define que las patentes podrán obtenerse por todas las invenciones, en todos los campos de la tecnología, también ofrece la posibilidad de excluir algunas materias como los usos, los métodos de diagnóstico, terapéuticos y quirúrgicos, entre otras. Estas excepciones constituyen espacios para que las legislaciones nacionales de los países en desarrollo adecúen sus normas y pongan límites a la pro-

tección interminable por patente sobre las diferentes formas o aplicaciones de un mismo producto ("evergreening") [3]. En Cuba sólo se consideran patentables los productos y procedimientos (Decreto Ley 290) [4].

Estrategia de Protección por Patentes del CIGB

En consonancia con el orden internacional imperante y como parte del Sistema Nacional de Propiedad Industrial que establece la Resolución No.21/2002 del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente de Cuba [5], el CIGB ha establecido un Sistema Interno, que ayuda a fomentar los conocimientos de propiedad industrial (PI) de todas las partes involucradas, que se activa desde el momento en que se concibe un proyecto de investigación y que coadyuva a diseñar una estrategia eficiente desde la protección de sus resultados hasta su exitosa comercialización.

La estrategia del CIGB incluye la evaluación de la novedad de los proyectos desde su inicio y durante su evolución, para definir el momento oportuno en que debe presentarse una solicitud de patente, teniendo en cuenta que la patente debe divulgar la invención de manera clara y completa desde la primera solicitud; velando además que no se divulguen resultados patentables antes de la presentación.

La primera presentación de una solicitud de patente en Cuba, origina un derecho de prioridad para reclamar la novedad de la invención en otros países antes de que venzan los 12 meses, según el Art. 4 del Convenio de París [6]. En ese plazo se presenta una solicitud a través del Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT) [7] que constituye una solicitud provisional para los 157 países signatarios, la cual es válida por 30 meses, al final de los cuales se tienen que definir los países donde se hará la extensión de la

solicitud PCT (fase nacional) [8]. Paralelamente al PCT, la solicitud se presenta en otros países que no pertenecen al Tratado.

Durante los 30 meses antes de la fase nacional del PCT se realizan las pruebas de concepto que reafirman algunas hipótesis presentadas en la solicitud original. En caso de que esas hipótesis no sean correctas, se procede a abandonar la solicitud. En ese periodo se recibe el Informe de Patentabilidad del PCT que nos ayuda a conocer, a través de la opinión de un experto, si la invención cumple con los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial. Este informe es una herramienta importante para definir la continuidad de la solicitud o redireccionar los proyectos, de ser posible.

El costo de la tramitación y mantenimiento de una patente es extremadamente elevado, fundamentalmente porque los derechos son territoriales. A través del PCT sólo se presenta una solicitud, la cual debe transcurrir por un proceso de examen para su concesión en cada uno de los países donde se inicie una fase nacional. Esto exige perfilar la estrategia de presentación internacional hacia aquellos lugares con amplias posibilidades de generar ingresos por su explotación, que cubran los gastos de inversión y genere utilidades. La estrategia para la fase nacional del PCT del CIGB incluye de 12 a 25 países y va dirigida a aquellos que constituyan mercados potenciales y a los de mayor desarrollo tecnológico.

Como cada país realiza un examen independiente, es necesario analizar periódicamente la evolución de los proyectos, en correspondencia con lo que va re-

sultando de los exámenes de patentabilidad, para abandonar la solicitud en caso de que estos no sean los deseados.

Durante sus 30 años de vida, el Centro ha protegido 135 invenciones por solicitud de patente en Cuba, que han sido extendidas geográficamente dando origen a 1,623 solicitudes de patente (de fase nacional) en todo el mundo, de las que 801 se han otorgado como patente.

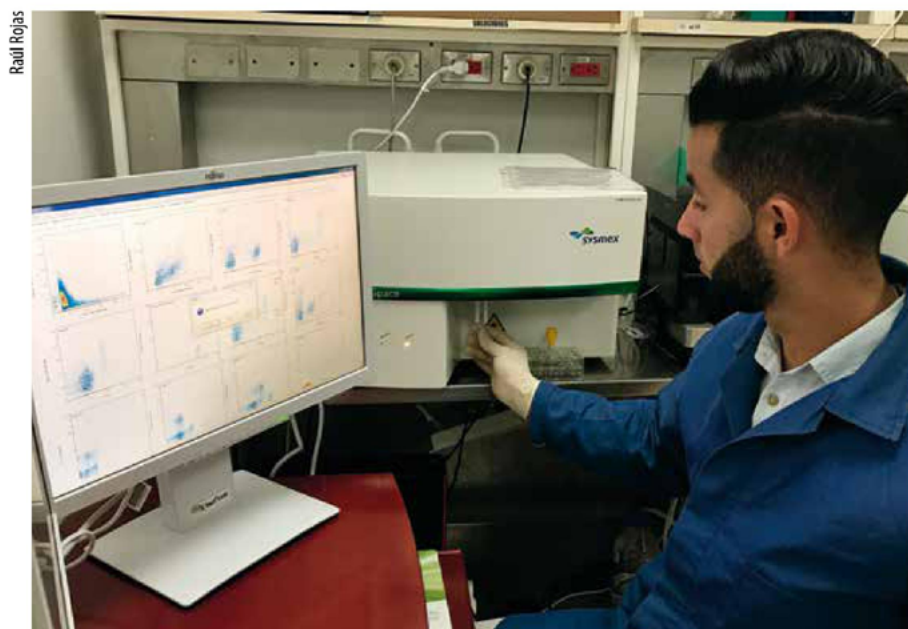


En vista de que la vigencia de las patentes es de 20 años,

hasta diciembre del 2015, se encontraban vigentes 62 de las 135 invenciones protegidas, que corresponden a 1,192 solicitudes de patente de fase nacional en todo el mundo, estando otorgadas como patente 496 de ellas. 43 de las 62 invenciones vigentes (es decir un 70%) se encuentra en explotación, lo mismo por terceros a través de licencias de explotación o directamente por el Centro, como productos de su comercialización. La figura 1 muestra la distribución de las solicitudes y patentes vigentes del CIGB por territorios.

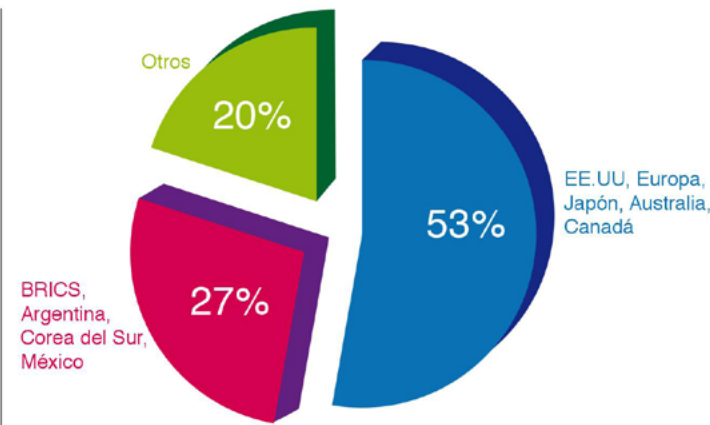
Para mejor ilustración de la estrategia de propiedad industrial expuesta y sus implicaciones, presentamos un caso de estudio de una de las patentes del CIGB presentada en el 2011 en Cuba,

Durante sus 30 años de vida, el Centro ha protegido 135 invenciones por solicitud de patente en Cuba, que han sido extendidas geográficamente dando origen a 1,623 solicitudes de patente (de fase nacional) en todo el mundo, de las que 801 se han otorgado como patente.



Raúl Rojas

Figura 1. Distribución actual por territorios de las solicitudes de patente del CIGB en el extranjero.



cuyo proyecto de investigación fue aprobado después del análisis sobre las posibilidades de obtención de resultados patentables, atendiendo también a las necesidades del mercado.

Caso de estudio

La solicitud de patente que mostramos contiene varios objetos de invención, con un único concepto inventivo: 1) cuatro sustancias relacionadas (A-A1-A2-A3), 2) la composición farmacéutica que las contiene y las dosis de los componentes que la conforman, 3) la

combinación de estas sustancias con otro compuesto (B) y las dosis de sus componentes dentro de la combinación, 4) el uso de esas sustancias y 5) el método para el tratamiento usando las sustancias y combinaciones en el tratamiento de varias enfermedades relacionadas (X-X1-X2). En la tabla 1 presentamos el análisis de esta solicitud de patente, examinada bajo las legislaciones de Cuba, de la Oficina Europea de Patente (OEP) [8] y de EE.UU. [9].

La solicitud presentada en Cuba incluyó todos los objetos de invención posibles, independien-

temente de lo que se considera patentable según la legislación nacional. Sin embargo, el alcance de cada patente concedida, es significativamente diferente. En Cuba se aceptaron la composición farmacéutica y la combinación, ambas con las proporciones cualitativas-cuantitativas de sus componentes. En la OEP, fueron aceptados todos los objetos de invención, exceptuando la materia relacionada con el método de tratamiento. Mientras que en EE.UU., hasta ese momento, sólo se había obtenido la protección para la combinación farmacéutica y su aplicación en un método de tratamiento.

En EE.UU. el examinador consideró que no había un único concepto inventivo, sino cinco grupos de invención. Para continuar el examen, fue necesario elegir uno de los grupos. Para que todos los objetos de invención queden protegidos, es necesario presentar cuatro solicitudes divisionales, lo que encarece significativamente la tramitación, pues cada divisional se paga como una solicitud independiente, aunque todas vencen al mismo tiempo. Esta objeción no la recibimos ni en el PCT, ni en ningún otro país.

Tabla 1. Análisis de los resultados del examen de patentabilidad de una solicitud de patente del CIGB bajo las legislaciones de Cuba, OEP y EE.UU.

Objetos de Invención (OI)	Solicitud original	Patentes concedidas			Divisionales EE.UU.	
		CU	EP	EE.UU.	I	II
Sustancias	A-A1-A2-A3					
Composición farmacéutica	A1-A2-A3					
Concentraciones de las sustancias en la composición	A1-A2-A3					
Uso de las sustancias para enfermedades X-X1-X2	A-A1-A2-A3					
Método de tratamiento para enfermedades X-X1-X2	A-A1-A2-A3					
Combinación farmacéutica	(A o A1 o A2 o A3)+B					
Dosis de los compuestos por combinaciones	(A-A1-A2-A3)+B					
Uso de las combinaciones	(A-A1-A2-A3)+B					
Método de tratamiento con combinaciones	(A-A1-A2-A3)+B					

■ Concedido en Cuba
 ■ Concedido en EPO
 ■ Concedido en EE.UU.
 ■ Solicitudes divisionales

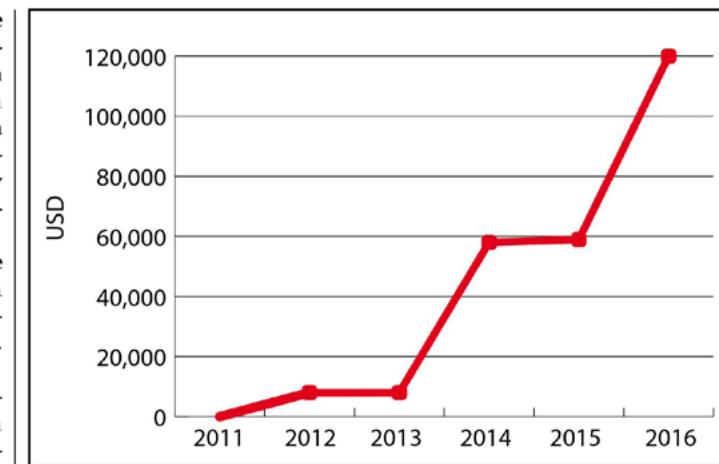


Figura 2. Gastos acumulados de la solicitud de patente en estudio.

Si la solicitud originalmente presentada en Cuba solo hubiera abarcado lo que se considera patentable según la legislación vigente, se hubiera perdido la posibilidad de obtener cobertura por patentes para el uso y método de tratamiento otorgados bajo las otras legislaciones.

La evolución acumulativa de los gastos por la presentación de la solicitud de patente en estudio, en sus 6 años de gestión, se muestran en la Figura 2.

Los picos representan los momentos en que se realizaron las presentaciones, que constituyen los de mayor impacto en la curva de gastos, pues incluyen la traducción y la tasa de presentación en cada país. En el 2012 se hizo la solicitud a través del PCT y en un país no-PCT; en el 2014 se presentó la fase nacional del PCT en 12 países y en el 2016 se presentó la primera divisional en EE.UU. y fue concedida la Patente Europea que validamos en 16 países de la OEP. En resumen, esta solicitud generó una familia de 29 solicitudes de patentes, que en 6 años ya había gastado en su tramitación alrededor de 120 mil USD.

Este proyecto se encuentra en estos momentos en negociación para su desarrollo.

El CIGB se mantiene perfeccionando su estrategia para la protección de sus resultados novedosos por patente, en correspondencia con su estrategia comercial, la cual lo coloca en una mejor posición para la negociación de sus proyectos y productos resultantes en el mercado internacional. Sin una eficiente estrategia de protección por patentes de los resultados, es imposible lograr la inserción en el mundo globalizado que vivimos hoy.



Raúl Rojas

Referencias

1. Acuerdo sobre los ADPICs. OMPI (1998), <http://www.wto.org/spanish/tratop>.
2. Decreto-Ley 68, Cuba. (1983), "De las Invenciones, Descubrimientos Científicos, Modelos Industriales, Marcas y Denominaciones de Origen".
3. Correa C.M. (2010). Guía sobre Patentes Farmacéuticas. Colección CEIDIE (Centro de Estudios Interdisciplinarios de Derecho Industrial y Económico, Argentina).
4. Decreto-Ley 290 Cuba, (2012), "De las Invenciones y Dibujos y Modelos Industriales".
5. Resolución No.21 (2002), del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente de Cuba.
6. OMPI, (1967), Convenio de París <http://www.wipo.int/treaties/es/ip/paris/>. Consultado en septiembre 2016.
7. OMPI, (1994), Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT). <http://www.wipo.int/pct/es/texts/index.htm>. Consultado en septiembre de 2016.
8. OMPI, (2014), Guía del solicitante del PCT, <http://www.wipo.int/pct/es/texts/index.htm>. Consultado en septiembre de 2016.
9. CPE (Convención de la Patente Europea) 15th Edición 2015 <http://www.epo.org/law-practice/legal-texts/epc.html>. Consultado en septiembre de 2016.

La M. en C. Mariela Vázquez Castillo es Agente Oficial de Patente del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

Contacto: mariela.vazquez@cigb.edu.cu



ANÁLISIS DE LAS TRANSFERENCIAS TECNOLÓGICAS DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM, EN LOS ÚLTIMOS 20 AÑOS

Mario Trejo Loyo y Enrique Galindo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos C.P. 62230, mtrejo@ibt.unam.mx.

Transferencia, Licenciamiento, Biotecnología.

Introducción. El Instituto de Biotecnología (IBT) fue fundado en 1982 (como Centro de Investigación en Ingeniería Genética y Biotecnología CEINGEBI) con una vocación que incluye la generación de conocimiento de frontera y la formación de recursos humanos (1). El IBT tiene también una clara vocación en transferencia tecnológica. Desde 1987 creó su Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología (adscrita a su Secretaría de Vinculación desde 2014), que se ha encargado de apoyar y propiciar la protección por patente de los desarrollos tecnológicos generados. El presente trabajo presenta un análisis de los licenciamientos y transferencias tecnológicas del IBT (referidos conjuntamente como Transferencias o TFs) en los últimos 20 años, que han sido complementarios de su actividad científica y de formación de recursos humanos.

Metodología. Estudio de Caso.

Resultados. Uno de los elementos más representativos del quehacer tecnológico de una institución académica, además de su actividad en la protección de sus derechos de propiedad industrial (DPI) por patente, es la transferencia de tecnología hacia el sector productivo, que una vez que produce los bienes y servicios derivados de la tecnología, satisface necesidades de la sociedad, cerrando el círculo virtuoso de la innovación. En este trabajo se analizan las Transferencias del IBT en los últimos 20 años (1997-2016). Esta actividad ha ido creciendo considerablemente. De las 26 TFs del IBT realizadas en estos 20 años, 18 de ellas se han concretado en los últimos 8 años.

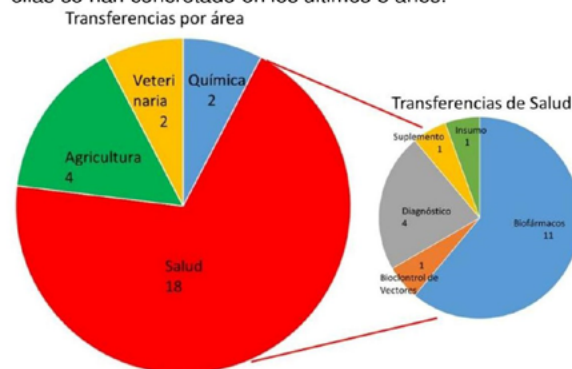


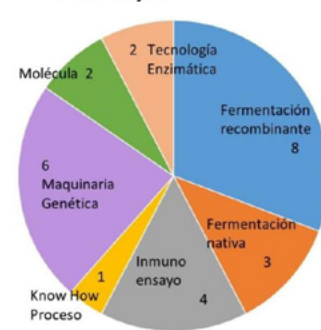
Fig. 1 Transferencias del IBT por área.

Como se muestra en la figura 1, el IBT ha transferido tecnología en 4 áreas, siendo las principales: la Agricultura (2 relacionadas con bioinsecticidas, 1 biofungicida y 1 gen de tolerancia al estrés) y la Salud, con 18 TFs, de las que resaltan 11 relacionadas con

biofármacos y 4 con diagnósticos.

De estas 26 TFs, en 12 de ellas la tecnología transferida es de proceso, mientras que en otras 14 la tecnología es de producto. 16 de estas tecnologías fueron previamente protegidas por sendas solicitudes de patente (aún y cuando no estuviesen otorgadas al momento de la transferencia). Las otras 10 tecnologías estuvieron protegidas por secreto industrial.

En cuanto al tipo de tecnología, como se muestra en la figura 2, 8 de las 26 TFs se basan en fermentaciones con microorganismos recombinantes y 3 en fermentaciones con microorganismos nativos, 6 consistieron de elementos o maquinarias genéticas (principalmente genes) y 4 más fueron inmunoensayos.



Por ubicación geográfica de las empresas, 17 TFs (65.4%) se hicieron a empresas mexicanas y 9 (34.5%) a empresas del extranjero, de las cuales 3 son norteamericanas y 6 europeas. Las TFs fueron recibidas por 11 empresas mexicanas (3 de ellas recibieron más de una TFs) y 8 empresas extranjeras, (1 de ellas recibió más de una TFs).

Fig. 2. Clasificación de las TFs por tipo de tecnología.

Conclusiones. La creación temprana de una estructura *ad hoc* de gestión tecnológica así como los contactos empresariales de los investigadores involucrados, le ha permitido al IBT impulsar exitosamente no solo la protección de los DPI de la tecnología que genera, sino también su transferencia al sector productivo. Esta actividad se ha incrementado significativamente en los últimos 8 años y ha tenido mayor impacto en las áreas de Salud y Agricultura, tanto a nivel proceso como en nuevos productos. Estas TFs se han producido en un saludable balance cercano a 70/30 entre empresas mexicanas y extranjeras.

Agradecimiento. Se agradece a la Dirección General de Asuntos Jurídicos/UNAM por su apoyo legal en los respectivos convenios.

Bibliografía.

1. Informes Institucionales del CEINGEBI 1982-1990 y del IBT 1992-2016.



Protegiendo y comercializando biotecnología de punta, desde una Institución de Educación Superior. Descripción de un caso real.

Mario Trejo Loyo, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. 62210, mtrejo@ibt.unam.mx.

Palabras Clave: Protección, Comercialización, Biotecnología.

Uno de los objetivos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM es desarrollar biotecnologías competitivas, preferentemente en colaboración con la industria, para la solución de problemas en las áreas de salud, agropecuaria, industrial, energética y ambiental. Entre los retos que se enfrentan cuando se desarrolla tecnología, están su protección adecuada y su comercialización. Para el primero de ellos es necesario contemplar la figura jurídica más adecuada para proteger los derechos de propiedad industrial relacionados, y los países en los que resulta conveniente proteger los derechos, contar con la experiencia y/o apoyo suficientes, así como los recursos económicos necesarios. Para el segundo reto, se necesita el contacto con al menos una empresa con la capacidad de asimilar la tecnología, de completar las etapas restantes en su desarrollo y de llevar a cabo la comercialización de los productos de la misma.

En el caso de estudio, en el IBT se desarrollaron un par de péptidos aislados del veneno de un alacrán, que resultaron ser inmunomoduladores de un canal de potasio que solo está presente en linfocitos T y que está identificado como pieza central para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de condiciones autoinmunes, incluyendo enfermedades autoinmunes y el rechazo de órganos. El desarrollo se hizo hasta obtener las pruebas de concepto (electrofisiología de canales iónicos y evaluación fisiológica en ratas a las que se les indujo una condición autoinmune) con los que se comprobó la afinidad muy alta y sobre todo la muy alta especificidad de los péptidos hacia ese canal de potasio y ninguno otro.

En la Secretaría Técnica de Gestión y Transferencia de Tecnología del propio IBT, se identificó claramente que se trataba de materia objeto de patente, se realizaron las búsquedas de estado del arte y se corroboró que era nuevo e inventivo y su aplicación industrial era evidente y su potencial de aplicación era mundial. Se redactó (en inglés) y sometió una solicitud internacional de patente (PCT). La solicitud de patente se promovió entre las empresas mexicanas conocidas sin tener mayor éxito. Cuando la solicitud fue publicada a los 18 meses, una compañía europea la detectó y nos contactó. El modelo de negocios de esta compañía farmacéutica es de alto riesgo y se basa en adquirir moléculas farmacéuticas en etapa temprana y desarrollarlas, incluyendo el diseño de formulaciones, pruebas preclínicas y clínicas, escalamiento de la producción de la molécula y la formulación, hasta que estén listas para su comercialización y entonces sublicenciarlas a las grandes farmacéuticas para la comercialización de los productos.

Se realizaron demostraciones (a distancia y presenciales) de los resultados obtenidos (y corroborados por la empresa). La empresa hizo una primera oferta para obtener una licencia de la tecnología, la cual se negoció hasta llegar a un acuerdo. La empresa financió la entrada en fases nacionales de la solicitud de patente y se procedió a elaborar y negociar el convenio.

Entre los principales acuerdos están: el otorgamiento de la licencia exclusiva y mundial sobre la molécula, para cualquier uso y con el derecho a otorgar sublicencias; el compromiso de la empresa por desarrollar la molécula conforme a un plan de desarrollo diseñado *ad hoc*; el manejo de las patentes por parte de la empresa; asistencia técnica; confidencialidad; y un paquete económico como contraprestación, que incluyó un pago frontal, 12 pagos por metas cumplidas que la empresa logre conforme al plan de desarrollo, un porcentaje sobre los ingresos que obtenga por el otorgamiento de las sublicencias, y regalías sobre ventas netas en caso de que finalmente comercialicen los productos en forma directa.

Mediante el licenciamiento de tecnología es posible hacer llegar los beneficios de la misma a la sociedad, en este caso a enfermos autoinmunes, además del conocimiento generado que se transmite a la comunidad científica, y la formación de recursos humanos involucrados, con lo que se cumple con los objetivos académicos y sociales de la institución.

REFERENCIAS:

Solicitud WO2008/139243A1 y Patentes EP2158213; US839477 y MX298891.

M. Trejo L. y M. Patiño V. (2016). Obtiene el IBT cinco nuevas patentes en 2015. Biotecnología en Movimiento No. 4, Enero-Febrero-Marzo, páginas 16-17.



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

