



No. 13-105491- -00000-0000

Fecha: 2013-04-25 14:48:49

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 92



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: PÉPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPIÓN RHOPALORUS
JUNCEUS Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C07K 14/435

71. SOLICITANTE: GRUPO EMPRESARIAL DE PRODUCCIONES
BIOFARMACEUTICAS Y QUIMICAS

DOMICILIO: Avenida Independencia Km 16 1/2, Santiago
de las Vegas, Boyeros, La Habana 17200,
CUBA

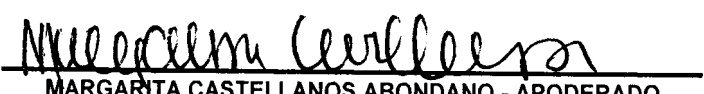
74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., _____



Fecha: 2013-04-25 14:48:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de Invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/CU2011/000006	Fecha 27/09/2011
Publicación Internacional No.		WO/2012/041261	Fecha 05/04/2012
3	(54) TITULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
PÉPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPIÓN RHOPALORUS JUNCEUS Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA			
4	CLASIFICACION INTERNACIONAL (51) CIP		
C07K 14/435			
5	(71) SOLICITANTE(S) _____ Esta persona también es inventor Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS O RAZON SOCIAL GRUPO EMPRESARIAL DE PRODUCCIONES BIOFARMACEUTICAS Y QUIMICAS		NOMBRE	IDENTIFICACION TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCION		Avenida Independencia Km 16 1/2, Santiago de las Vegas, Boyeros	No. TELEFONO
CIUDAD		La Habana 17200	E-MAIL
PAIS DE RESIDENCIA		CUBA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CUBA CONSTITUCION
7	(72) INVENTOR(ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. FRAGA CASTRO	José, Antonio	CUBANA	
2. MEDINA GALI	Regla, María	CUBANA	
3. DIAZ GARCIA	Alexis	CUBANA	
4. GUEVARA ORELLANES	Irania	CUBANA	
5. RODRIGUEZ TORRES	Caridad, Clara	CUBANA	
6. RODRIGUEZ COIPEL	Judith	CUBANA	
DIRECCION DE CORREO ELECTRONICO:			
8	DATOS INVENTOR(ES)		
PAIS RESIDENCIA	CIUDAD	DIRECCION	
1. CUBA	La Habana 11300	Calle 5ta. No. 8607 Apto 2 entre, 86 y 88. Playa	
2. CUBA	La Habana 11300	Calle 308 Edif. 13, Apto 1, entre 21 E y 21 B. Reparto Barbosa, Playa	
3. CUBA	La Habana 10400	Zapata No. 1465, Apto 14 entre A y B Vedado, Plaza	
4. CUBA	La Habana 19290	Calle 373, Edificio 75 Apto 26 entre 178 y 184 Mulgoba. Boyeros	
5. CUBA	La Habana 10500	Calle 16 No. 230 entre B y C. Lawton, 10 de Octubre	
6. CUBA	Mayabeque 33500	Calle 3ª Edif. B apto 2, Rpto. Santa Mónica. Quivicán	
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)			
_____ Los demás solicitantes y/o demás inventores se indican en una hoja a continuación			
9	(74) _____ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACION
CASTELLANOS ABONDANO		MARGARITA	C.C. 39.779.654 T.P. 70.819
DIRECCION		Calle 94A No. 7A-09	No. TELEFONO 7560770
CIUDAD		BOGOTA	E-MAIL info@castellanosyco.co
PAIS		COLOMBIA	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
1.	(33) PAIS DE ORIGEN CUBA	CODIGO PAIS CU	(31) NUMERO 2010-0186
2.			(32) FECHA (AAA/MM/DD) 27/09/2010
3.			
4.			
5.			
11	DECLARACION SOBRE USO DE RECURSOS GENETICOS O BIOLOGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen. ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina. ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCION DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	Entidades sin animo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de Comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar.
14	AUTORIZACION DE NOTIFICACION EN LINEA ☐ SI ☒ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deber ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRONICO	N° 13-0038568 ; 13-0038569	Fecha: 27/09/2013
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)		
 MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO - APODERADO			
16	ORDEN Y RELACION DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en Castellano ☒ Descripción N° de folios: 36 ☒ Reivindicaciones N° de reivindicaciones: 14 ☒ Dibujos y/o figuras N° de folios: 6 ☒ Resumen ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. ☐ Arte final 12 x 12 ☐ Anexo formato digital.		Documentación Jurídica ☒ Poderes, si fuera el caso. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACION	
☒ Patente de Invención		FECHA DE PRESENTACION		
☐ Patente de Modelo de Utilidad				
4	(71) SOLICITANTE(S)			
2.	APELLIDOS O RAZON SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACION
3.				TIPO
4.				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAIS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCION
2.				
3.				
4.				
TELEFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.				
3.				
4.				
6	(72) INVENTOR(ES)			
APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD
7.	RIQUENES GARLOBO	Yanelis		CUBANA
8.	GONZALEZ MARRERO	Isbel		CUBANA
9.	PEREZ CAPOTE	María, Regla		CUBANA
10.				
11.				
12.				
7	DATOS INVENTOR(ES)			
DIRECCION			CIUDAD	PAIS RESIDENCIA
6.	Línea No. 1253 Apto. 11 esq. 20, Vedado, Plaza		La Habana 10400	CUBA
7.	Estrada Palma no. 509 Apto 4, entre Juan Delgado y Goicuría. Santos Suárez. 10 de Octubre		La Habana 10500	CUBA
8.	Calle 375 No. 17836 Apto 18 entre 178 y 184. Mulgoba, Boyeros		La Habana 19290	CUBA
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
(33) PAIS DE ORIGEN		CODIGO PAIS	(31) NUMERO	(32) FECHA (AAA/MM/DD)
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0038568

Bogotá D.C., Abril 24 de 2013 - 15:04:50

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	418972540	24/04/2013	10.845.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-105491- -00000-0000

Fecha: 2013-04-25 14:48:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 24 de 2013 - 15:04:52

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0038569

Bogotá D.C., Abril 24 de 2013 - 15:04:50

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	418972540	24/04/2013	10.845.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
4	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	120.000.00
				\$120.000.00

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-105491- -00000-0000
Fecha: 2013-04-25 14:48:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

COLOMBIA

PODER

El (los) Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas, en forma abreviada LABIOFAM.

Domiciliado en Ave Independencia Km 16 ½ municipio Boyeros, provincia La Habana, Cuba.

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

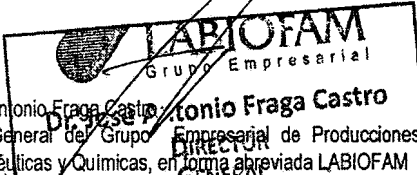
y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso -administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de protección de variedades vegetales
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Para la obtención de registros de derechos de autor.
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado en La Habana hoy 16 de noviembre de 2011.


Dr. José Antonio Fraga Castro
Director General del Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas, en forma abreviada LABIOFAM

(El notario debe suscribir el documento en la página siguiente)
(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.com

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

Of

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and for MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of plant variety protection
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- For the obtainment of copyright registrations
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this

in

by

(Notary shall execute on the other side)
(Consular legalization or apostille is required)

CASTELLANOS & Co.
PROPERTY LAW FIRM

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
5 de abril de 2012 (05.04.2012)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/041261 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/435 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2011/000006

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de septiembre de 2011 (27.09.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2010-0186
27 de septiembre de 2010 (27.09.2010) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **GRUPO EMPRESARIAL DE PRODUCCIONES BIOFARMACEUTICAS Y QUIMICAS** [CU/CU]; Avenida Independencia Km 16 1/2, Santiago de las Vegas, Boyeros, La Habana 17200 (CU).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **FRAGA CASTRO, José, Antonio** [CU/CU]; Calle Sta. No. 8607 Apto 2, entre 86 y 88. Playa, La Habana 11300 (CU). **MEDINA GALL, Regla, María** [CU/CU]; Calle 308 Edif.13, Apto 1, entre 21 E y 21 B. Reparto Barbosa, Playa, La Habana 11300 (CU). **DIAZ GARCIA, Alexis** [CU/CU]; Zapata No. 1465, Apto 14 entre A y B, Vedado, Plaza, La Habana 10400 (CU). **GUEVARA ORELLANA, Irania** [CU/CU]; Calle 373, Edificio Mulgoba, Boyeros, La Habana 19290 (CU). **RODRIGUEZ TORRES, Caridad, Clara** [CU/CU]; Calle 16 No. 230 entre B y C. Lawton, 10 de Octubre, La Habana 10500 (CU). **RODRIGUEZ COPEL, Judith** [CU/CU]; Calle 3ª edif. B apto 2, Rpto. Santa Mónica, Quivicán, Mayabeque 33500 (CU). **RIQUENES GARILOBO, Yanelis** [CU/CU]; Línea No. 1253 Apto. 11 esq. 20, Vedado, Plaza, La Habana 10400 (CU). **GONZALEZ MARRERO, Isbel** [CU/CU]; Estrada Palma no. 509 Apto 4, entre Juan Delgado y Goicurúa.

Santos Suárez, 10 de Octubre, La Habana 10500 (CU). **PEREZ CAPOTE, María, Regla** [CU/CU]; Calle 375 No. 17836 Apto 18 entre 178 y 184. Mulgoba, Boyeros, 19290 La Habana (CU).

(74) Mandatario: **RUIZ SOTO LONGO, María, Lourdes**; Claim S. A., Lamparilla No. 2, Edificio Lonja del Comercio, Planta Baja, Sección G, La Habana 10200 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AF, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GF, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

— con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: PEPTIDES FROM THE VENOM OF THE RHOPALURUS JUNCUS SCORPION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) Título : PEPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPION RHOPALORUS JUNCUS Y COMPOSICION FARMACEUTICA

(57) Abstract: The invention relates to novel peptides obtained from the venom of the Rhopalurus juncus scorpion, characterised by a high content of proteins, lipids, carbohydrates, amino acids, inorganic salts and other ions including peptides as active principles. The invention also relates to a formulation used as a drug due to the properties thereof, such as its anti-carcinogenic, analgesic and anti-inflammatory properties which improve the quality of life of cancer patients.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con nuevos péptidos obtenidos a partir del veneno de escorpión Rhopalurus juncus el que se caracteriza por un alto contenido en proteínas, lípidos, carbohidratos, aminoácidos, sales inorgánicas y otros iones incluidos péptidos como principios activos. La invención también incluye una formulación empleada como medicamento por sus propiedades como anticancerígeno, analgésico y antiinflamatorio que conducen a la elevación de los índices de la mejora de la calidad de vida en pacientes con enfermedades oncológicas.

WO 2012/041261 A2

PÉPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPIÓN *RHOPALURUS JUNCEUS* Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona fundamentalmente con las industrias farmacéutica, y en particular con la identificación de péptidos obtenidos del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*, de la familia *Buthidae*, género: *Rhopalurus*, especie: *R. junceus*, nombre vulgar: Alacrán "colorado" que contiene una mezcla de péptidos, proteínas, aminoácidos y aminos libres.

Arte previo

Los escorpiones son artrópodos terrestres y entre los animales ponzoñosos constituyen el grupo más antiguo pues fueron los primeros que aparecieron en la tierra. Existen aproximadamente más de 1500 especies de escorpiones los cuales han sido ubicados taxonómicamente en el orden Escorpiones, clase *Arachnida* del Phylum *Arthropoda*. En sus condiciones naturales, el veneno de los escorpiones es un fluido opalescente, lechoso, con un pH 7.12, que contienen mucus, lípidos, carbohidratos, aminoácidos, sales inorgánicas, moléculas orgánicas de bajo peso molecular y una gran variedad de proteínas con pesos moleculares entre 3 kDa y 90 kDa las cuales constituyen el componente mayoritario. En los últimos tiempos se han incrementado las investigaciones relacionadas con los venenos de escorpión debido a la gran variedad de péptidos presentes, los que han demostrado un gran espectro de actividad farmacológica y por tanto invaluable herramientas en el campo de las investigaciones biomédicas (Martin-Eauclaire M-F, Sjøgaard M, Ramos C, Cestele S, Bougis PE, and Svenson B. Production of active insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. *Eur. J. Biochem.* 1994; 223:637-45; Bednarek MA, Bugianesi RM, Leonard RJ, Felix JP. Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jan 28; 198(2):619-25). En este sentido en los últimos años se han incrementado las publicaciones patentes y no patentes relacionadas con la actividad de estas toxinas y sus derivados como anti-inflamatorias (Rajendra W, Armugam A and Jeyaseelan K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon* 2004 July; 44(1):1-17), analgésicos (Guan RJ, Wang CG, Wang M and Wang DC. A

depressant insect toxin with a novel analgesic effect from scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1549(1):9–18), en el tratamiento del cáncer (Liu YF, Ma RL, Wang SL, Duan ZY, Zhang JH, Wu LJ and Wu CF. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2003; 27(2):253–8; Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *J Neurooncol.* 2005 May; 73(1):1-7) y enfermedades neurodegenerativas (Rajendra W, Armugam A and Jeyaseelan K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon* 2004 July; 44(1):1-17). Las invenciones en cuya composición está contenido el escorpión y/o su veneno abarcan una amplia variedad de formulaciones encaminadas al tratamiento del cáncer. En los documentos de patentes CN 1073480, 1993 y CN 1076858, 1993 los autores refieren la obtención de un vino que permite el tratamiento y prevención del cáncer, en ambos casos por la mezcla del escorpión y materiales provenientes de plantas y otros animales.

El escorpión representa uno de los componentes de formulaciones en forma de tabletas para el tratamiento de cáncer primario de hígado (CN 1265901, 2000 y CN 1279088, 2001) y de cápsulas que inhiben el crecimiento de células tumorales y pueden curar el cáncer en pacientes (CN 1391941, 2003). Otras patentes describen variadas formulaciones para el tratamiento del cáncer (CN 1252321, 2000; CN 1316249 2001; CN 1399979, 2003).

Por otro lado existen patentes referidas a la utilización exclusiva de toxinas, obtenidas a partir del veneno de escorpión, con actividad sobre determinados tipos de células tumorales. Los primeros trabajos con toxinas provenientes de venenos de escorpión demostraron la obtención de un péptido a partir del escorpión hebreo *Leiurus quinquestriatus*. Dicha toxina, un péptido de 4 KDa nombrada clorotoxina, tiene la capacidad de unirse a los canales de cloruro expresados en los gliomas (tumores primarios de cerebro provenientes de la glia (DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol* 1993; 264:361-369). A partir de estos descubrimientos, en 1999 Ullrich et al., describieron en la patente US 5 905 027 un método de diagnóstico y tratamiento de gliomas. Otros trabajos que toman como base la especificidad de acción de la clorotoxina sobre determinados

receptores celulares en los gliomas, mostraron que esta toxina es un marcador altamente específico para otros tipos de tumores, cuyas células presentan un origen embrionario común con las células del Sistema Nervioso Central (SNC) (Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H: Chlorotoxin, a scorpion derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. GLIA 2002; 39:162–73.).

Adicionalmente recientes trabajos demostraron que además de inhibir el crecimiento “in vitro” de los gliomas, la clorotoxina, tiene la capacidad de impedir la invasión y diseminación de este tipo de tumores hacia zonas del cerebro no dañadas debido a su interacción específica y selectiva con las metaloproteinasas las cuales son enzimas que están relacionadas con la elevada tasa de invasividad de este tipo de cáncer (Deshane J, Garner CC and Sontheimer H: Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. J Biol Chem 2003; 278:4135–44). En 2004 aparece publicada otra patente relacionada con la actividad antitumoral de una toxina, aislada del escorpión *Buthus martensis karsh*, sobre tumores implantados en animales (EP20020774251)

En algunos casos existen una gran variedad de formulaciones que tienen la propiedad de tratar o curar el cáncer, representados por las patentes descritas, sin embargo en estos casos no se demuestra que esta cualidad sea exclusiva de algunos de los tipos de escorpiones o toxinas involucrados en la elaboración de las mismas. Por otro lado, las toxinas descritas, provenientes de los escorpiones *Leiurus quinquestriatus* no presentan actividad antitumoral *per se* como el caso de la clorotoxina y *Buthus martensis karsh*, permite el tratamiento solo de determinados tipos tumores en forma de toxinas aisladas y no como una mezcla de proteínas presentes en el veneno completo.

En Cuba existe una patente de una solución diluida del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* con actividad antitumoral demostrada empíricamente en estudios realizados. En estos trabajos se administró la solución en animales domésticos con tumoraciones espontáneas y se observó reducción del tumor, obliteración y elevada sobrevida (CU 22413 A1). La formulación de la presente invención posee propiedades distintivas sobre la base de que no se conoce formulación alguna en la rama farmacéutica, para el tratamiento y la mejoría de la calidad de la vida que se reivindica en la presente invención.

Descripción detallada de la Invención

La composición y las actividades farmacológicas de la presente invención del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* y/o sus derivados, le confieren un alto valor como medicamento de origen natural, así como actividad anti-inflamatoria, analgésica y anticancerígena que lo diferencia sustancialmente de otros productos similares en el mercado. Es completamente de origen natural donde se combinan componentes de elevada eficacia ante las células tumorales (péptidos), con otros que le confieren actividad analgésica y anti-inflamatoria. Adicionalmente, ejerce su acción beneficiosa a través de la inducción de apoptosis de células tumorales y a través de sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Estas características le confieren un alto valor para la mejoría de la calidad de vida en pacientes con enfermedades oncológicas y procesos inflamatorios asociados. Se ha encontrado que la composición del producto natural, objeto de la presente invención, está representada por un conjunto de proteínas de bajo peso molecular con actividad anti-cancerígena *in vitro*, cuya acción confirma una potencial actividad antitumoral *in vivo*.

Un objeto de la presente invención es la determinación de la composición y la descripción de los péptidos que constituyen los principios activos, presentes en el veneno, con actividad antitumoral. El resumen de la composición cualitativa, el tamizaje químico, las propiedades físico-químicas y la actividad farmacológica del veneno de escorpión se muestran en la Tabla I, II, III, IV, V, VI y VII respectivamente.

Tabla I. Tamizaje Químico del veneno completo de *Rhopalurus junceus*, que se emplea en las formulaciones de la presente invención.

Ensayo	Resultados
Ensayo de Dragendorff	negativo
Ensayo del Cloruro Férrico	negativo
Ensayo de Shinoda	negativo
Ensayo de Lieberman-Burchard	negativo
Ensayo de Ninhidrina	positivo
Carbohidratos	positivo
Lípidos	positivo

Tabla II. Determinación de iones metálicos presentes en el veneno completo de *Rhopalurus junceus*.

muestra	Na (mg/L)	Mg (mg/L)	K (mg/L)	Cu (mg/L)	Zn (mg/L)	Cd (mg/L)	Pb (mg/L)
Veneno de escorpión	114 ± 21	4.12 ± 0.28	4.66± 0.35	0.069±0.006	11.18±0.7	<0.004*	<0.01*

*metales pesados con niveles por debajo del límite inferior

5 Tabla III. Propiedades físico-químicas del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*., que se emplea en las formulaciones de la presente invención.

Propiedad	Índice de aceptación
pH	5-7
Contenido de proteínas	5-15 mg/mL
Apariencia	opalescente
Color	blanquecino

10 Tabla IV. Tabla de los pesos moleculares relativos de las proteínas (PMR), presentes en el veneno de escorpión, obtenidos mediante exclusión molecular empleando cromatografía líquida de baja presión y por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Pesos moleculares relativos
≥72 kDa
60 kDa
45 kDa
30 kDa
14 kDa
8 kDa
≤4 kDa

Tabla V. Principios activos con actividad tóxica en células tumorales, identificados a partir del veneno completo de *Rhopalurus junceus*.

péptido	Peso molecular	Cantidad aminoácidos
RjLB-01	544.42 Da	10
RjLB-03	1964.0 Da	17
RjLB-04	4748.14 Da	43
RjLB-05	908.0 Da	8
RjLB-07	707.03 Da	7
RjLB-08	712.42 Da	17
RjLB-09	1203.44 Da	12
RjLB-14	5930.45 Da	50

5

Tabla VI. Resumen de los Estudios Toxicológicos

Toxicología General	Veneno de <i>R. junceus</i> (mg/kg)	Efecto
Toxicidad Aguda		
Vía Oral	2000	N. E.
Vía IP	5-20	DL ₅₀ =16,41mg/kg (M y H)
Irritabilidad		
Dérmica	-	N.E
Oftálmica	-	N.E
Mucosa Oral	-	N.E
Toxicidad a Dosis Repetida		
Toxicidad dosis repetida oral (28 días)	100	N.E
Toxicidad Subcrónica oral (90 días)	0,1-100	N. E.

Consumo de Agua y Alimentos		N. E.	
Ganancia de Peso		N. E.	
Parámetros Hematológicos y Bioquímicos		N. E.	
Peso Relativo de órganos		N. E.	
Anatomía Patológica		N. E.	
Toxicología Especial		Veneno de <i>R. juncus</i> (mg/kg)	Efecto
Micronúcleos en médula ósea de ratón	Oral(agudo)	2000	N.E
	Oral(dosis repetidas, 28 días)	100	N.E
	ip	4,10-13,13	N.E

Leyenda: N.E.-no efecto

Tabla VII. Resumen de los Estudios farmacológicos

Farmacología	Efecto
Antiproliferativo	Citotoxicidad en células tumorales epiteliales
Antitumoral	Retardo crecimiento tumores sólidos murinos
Antimetastásico	Disminución metástasis en pulmones en murinos
Analgesico	Disminución dolor SNC y periférico
Anti-inflamatorio	Disminución inflamación por vía tópica, oral, intraperitoneal

5

Para la determinación de la composición de la mezcla de la presente invención se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Determinación de proteínas totales por el método Lowry modificado.
- Tamizaje Químico

0

- Separación de los péptidos según grupos de pesos moleculares mediante Fraccionamiento por cromatografía líquida de baja presión mediante el uso de columna Superosa 12 HR 10/30.
- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- 5 • Separación del veneno completo y de los péptidos mediante Cromatografía líquida de alta resolución, empleando una columna C18 de fase reversa.
- Determinación de los espectros UV a longitudes de ondas 220nm y 280nm.
- Viabilidad celular en células normales y tumorales
- Análisis de cada uno de los péptidos de interés mediante espectrometría de masas.

El objeto de la presente invención es no tóxico, de acuerdo a los resultados mostrados en los ensayos de toxicidad aguda y subcrónica realizados en roedores.

Los estudios que se describen en detalle más adelante como ejemplos de realización del objeto de invención, no limitan en ninguna circunstancia el alcance de la presente solicitud.

Para la realización de los experimentos recogidos en los ejemplos de realización se tomaron varios escorpiones a los cuales se les extrajo el veneno por estimulación eléctrica y se diluyó en agua destilada convenientemente. Posteriormente se clarificó por centrifugación a 10 000 rpm durante 15 min. para eliminación de constituyentes como mucus y debris celular. Al mismo se le realizó la determinación de proteínas a través del método de Lowry, mostrando una concentración entre 5-15 mg/mL.

Vía de administración intraperitoneal (ip)

Primeramente se administraron la sustancia de ensayo y el control positivo. Pasados 30 min. se aplicaron entre 10-15µL de la solución de aceite de croton en cada una de las superficies (interna y externa de la oreja derecha del animal), la oreja izquierda se tomó como control. Transcurridas tres horas se sacrificaron los animales de acuerdo a las normas establecidas para la especie (según FELASA), se cortaron ambas orejas y ponches circulares con un diámetro de 8mm fueron tomados con un sacabocado y pesados en balanza analítica.

Vía de administración tópica

Primeramente se aplicaron los 25-30µL de la solución de aceite de croton en cada una de las superficies (interna y externa de la oreja derecha del animal, la oreja izquierda se tomó como control). Inmediatamente después se aplicó la sustancia de ensayo. Transcurridas tres horas se sacrificaron los animales de acuerdo a las normas establecidas para la especie (según FELASA), se cortaron ambas orejas y ponches circulares con un diámetro de 8mm fueron tomados con un sacabocado y pesados en balanza analítica.

Vía de administración oral

Se aplicaron 25-30µL de la solución de aceite de croton en cada una de las superficies (interna y externa de la oreja derecha del animal, la oreja izquierda se tomó como control). Inmediatamente después se administró oralmente las muestras de ensayo. Transcurridas tres horas se sacrificaron los animales de acuerdo a las normas establecidas para la especie (según FELASA), se cortaron ambas orejas y ponches circulares con un diámetro de 8mm fueron tomados con un sacabocado y pesados en balanza analítica.

La aplicación tópica de aceite de croton ofrece un modelo de inflamación de la piel apropiada para la evaluación de agentes antiinflamatorios. El principio activo del aceite de croton es el Phorbol-12-Myristate 13-Acetate (PMA), potente agente proinflamatorio, cuya aplicación epicutánea resulta en cambios histológicos y bioquímicos que incluyen aumento de la permeabilidad vascular y ruptura vascular, infiltración leucocitaria, activación de proteína C y liberación incrementada de ácido araquidónico y sus metabolitos. Además se conoce que el PMA es un poderoso activador de neutrófilos y la oreja posee una extensa y rica irrigación sanguínea.

Vía de administración ip

La administración ip. de las dosis de 1-5 mg/kg de peso corporal inhibió la inflamación inducida por aceite de croton en la oreja del ratón (Tabla VIII), siendo la dosis de 3 mg/kg más efectiva que la administración de 15 mg/kg de dexametasona vía ip en los animales de experimentación al tener un mayor porcentaje de inhibición de la inflamación (97% vs 60,86%). La dosis de 5 mg/kg no difirió estadísticamente ($p>0,05$) del control positivo (dexametasona).

Tabla VIII. Efecto de la administración intraperitoneal del veneno de *R. junceus* en el modelo de edema auricular en ratón

Grupo		Extinción del edema (mg)	% Inhibición de la inflamación
Control		7,043 ± 0,27 a	-
Veneno de <i>R. junceus</i>	1 mg/kg	5,050 ± 1,47 b	27,12
	3 mg/kg	1,483 ± 0,93 c	97,46
	5 mg/kg	4,020 ± 1,41 db	44,09
Dexametasona 15 mg/kg		3,117 ± 1,09 d	60,86

Los valores son la media ± D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. (p >0.05)

5

Vía de administración Oral

Al administrar oralmente 5, 10 y 20 mg/kg de veneno de *R. junceus* se aprecia una disminución significativa en el peso de las orejas con respecto al grupo control negativo (Tabla IX), pero que no es estadísticamente comparable con la inhibición de la inflamación producida por la dexametasona, fármaco antiinflamatorio esteroidal por excelencia que inhibe la fosfolipasa A₂ (enzima responsable de la vía del ácido araquidónico).

10

Tabla IX. Efecto de la administración oral del veneno de *R. junceus* en al modelo de edema auricular en ratón

Grupo		Extinción del edema (mg)	% Inhibición de la inflamación
Control		11,28 ± 1,29 a	-
Veneno de <i>R. junceus</i>	5 mg/kg	7,68 ± 0,50 c	35,72
	10 mg/kg	8,05 ± 0,57 c	37,39
	20 mg/kg	7,76 ± 1,01 c	38,02
Dexametasona 15 mg/kg		4,87 ± 0,95 b	53,70

15

Los valores son la media ± D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. (p>0,05)

Vía de administración tópica

La administración tópica del veneno de *R. junceus* provocó una disminución del edema auricular respecto al grupo control, como puede apreciarse en la Tabla X.

Tabla X. Efecto de la administración tópica del veneno de *R. junceus* en el modelo de edema auricular en ratón

Grupo		Extinción del edema (mg)	% Inhibición de la inflamación
Control		12,00 ± 0,48 a	-
Veneno de <i>R. junceus</i>	10 mg/kg	8,87 ± 0,66 c	28,23
	20 mg/kg	8,25 ± 0,83 c	21,70
Bencidamina		4,87 ± 1,40 b	67,60

Los valores son la media ± D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. (p>0.05)

En la Tabla XI se pueden apreciar los resultados correspondientes al estudio realizado. La administración por vía oral del veneno de *R. junceus* provocó una discreta inhibición del tejido granulomatoso a formarse respecto al grupo control negativo, lo que sugiere actividad en la fase proliferativa de la inflamación. Ambas dosis del producto en estudio presentaron un comportamiento similar.

Tabla XI. Efecto del veneno de *R. junceus* sobre los granulomas inducidos por pellets de algodón en ratas.

Grupo	Peso del granuloma (mg)	% inhibición
Control	103,33 ± 5,08 a	-
Dexametasona 3 mg/kg	55,40 ± 14,84 b	44,09
Veneno <i>R. junceus</i> 10 mg/kg	80,60 ± 4,74 c	20,95
Veneno <i>R. junceus</i> 20 mg/kg	83,10 ± 6,52 c	18,49

Los valores son la media $\pm$ D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. ($p > 0.05$)

En la Tabla XII se muestran los valores del peso del granuloma y del contenido de carmín para los diferentes grupos experimentales. La toxina redujo el peso del granuloma 1,32 y 2,05 veces respecto al grupo control ($p < 0,05$) a las dosis de 3 y 5 mg/kg respectivamente.

La angiogénesis es un proceso esencial para el crecimiento del tumor y la metástasis por lo que contar con productos capaces de inhibir este complejo proceso constituye una alternativa para el tratamiento de enfermedades asociadas a tumores.

El contenido de carmín es un indicador de la formación de nuevos vasos sanguíneos en el granuloma aéreo. La administración de toxina redujo la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido granulomatoso en un 39,22 % y 69,24 % a las dosis de 3 y 5 mg/kg (ip) respectivamente con una diferencia estadística significativa entre todos los grupos experimentales ($p < 0,001$).

Tabla XII. Efecto del veneno de *R. junceus* por vía intraperitoneal sobre el peso del granuloma y el contenido de carmín en la Angiogénesis Inflamatoria inducida por adyuvantes en ratas (n=10).

Grupo		Peso granuloma (g $\pm$ D.S)	Contenido de carmín (A $\pm$ D.S)
Control		5,26 $\pm$ 1,11 ^a	0,413 $\pm$ 0,014 ^a
Veneno de <i>R. junceus</i>	3 mg/kg	3,59 $\pm$ 0,33 ^b	0,251 $\pm$ 0,015 ^b
	5 mg/kg	2,56 $\pm$ 0,74 ^b	0,127 $\pm$ 0,020 ^c

Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente ($p > 0,05$)

A: absorbancia a 490 nm

En la Tabla XIII se reportan los resultados del efecto analgésico del veneno de *R. junceus* al ser inoculado vía ip en el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético al 3%, en ratones.

Todos los grupos tratados con las diferentes dosis de veneno mostraron una marcada disminución ($p < 0,05$) en el número de constricciones abdominales con respecto al grupo control negativo. Las dosis de 2,5 y 7,5 mg/kg de veneno produjeron un resultado similar al del grupo de la aspirina, reconocido agente analgésico. Por otra parte, la dosis de 5,0 mg/kg de veneno de *R. junceus* mostró un por ciento de inhibición superior (87,74%) al obtenido con la administración de 100 mg/kg de aspirina (49,28%).

Tabla XIII. Efecto de la administración intraperitoneal del veneno de *R. junceus* en el modelo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético.

Grupos experimentales	Dosis (mg/kg)	No. contorsiones $X \pm DS$	% inhibición del No. de contorsiones
CN	-	$36,22 \pm 5,11^a$	-----
ASA	150	$18,37 \pm 4,63^b$	49,28
Veneno de <i>R. junceus</i>	1	$22,25 \pm 4,53^b$	38,57
	2,5	$17,87 \pm 5,59^b$	50,66
	5	$4,44 \pm 4,33^c$	87,74
	7,5	$17,86 \pm 5,30^b$	50,69

10 CN: control negativo; No.: número

ASA: aspirina

Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente ($p > 0,05$)

Administración vía oral

15 Como se puede apreciar en la Tabla XIV, todos los grupos tratados con las diferentes dosis de veneno mostraron una marcada disminución ($p < 0,05$) en el número de constricciones abdominales con respecto al grupo control negativo.

Al comparar las dosis de veneno empleadas con el grupo control positivo (aspirina) se evidenció un marcado efecto analgésico. Las dosis de 10, 15 y 20 mg/kg de veneno de *R. junceus* produjeron una inhibición en las contracciones abdominales similares a la provocada por la aspirina; en tanto a pesar de que la dosis de 50 mg/kg no presentó diferencias estadísticas significativas con el control positivo, alcanzó un 54,78% de inhibición de las contorsiones abdominales en los animales de experimentación.

Tabla XIV. Inhibición de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético tras la administración oral del veneno de *R. junceus*

Grupos experimentales	Dosis (mg/kg)	% inhibición del No. de contorsiones
CN	-	-----
ASA	150	47,01
Veneno de <i>R. junceus</i>	1	18,84
	5	32,84
	10	36,23
	15	39,85
	20	43,19
	50	54,78

CN: control negativo; No.: número

5 ASA: aspirina

- Modelo de analgesia térmica en ratones.

Se empleó la metodología descrita en Drug Discover.

Se utilizaron ratones OF1, machos, peso promedio 20-25 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

10 Antes y después de la administración de la sustancia de ensayo los animales fueron puestos en un plato caliente (UGO-Basile) a temperatura constante de 55° C. Fue medida la latencia de la respuesta nociceptiva a través del lamido de las patas traseras o el salto. Solo los animales que mostraron respuesta nociceptiva antes de los 20 seg. Fueron tomados para el ensayo. El tiempo de corte fue de 40 seg.

15 Luego de administrar el control negativo (solución salina fisiológica), el control positivo (Codeína 4%) y las diferentes dosis del veneno de *R. junceus* se midió el tiempo de latencia de la respuesta para cada animal a las 2 y 3 horas.

En el presente trabajo se midió la reactividad nociceptiva al estímulo térmico en ratones utilizando el ensayo del plato caliente, el cual constituye una prueba de dolor agudo sensitivo para detectar analgesia opioide así como algunos tipos de reacciones hiperalgésicas de la espina dorsal. Se considera que una sustancia tiene propiedades analgésicas significativas cuando al ser administrada al animal, este duplica el tiempo normal de reacción.

20

El efecto analgésico del veneno de *R. juncus* se muestra en la Figura 1 y Tabla XV. Los resultados indican que la administración ip de las tres dosis del producto significativamente atenuó la estimulación térmica del plato caliente. En la Figura 1 se observa que las tres dosis de veneno de *R. juncus* incrementan significativamente los tiempos de latencia para mostrar respuesta nociceptiva en el ensayo de plato caliente en ratones.

La inhibición del dolor en los diferentes grupos experimentales se muestra en la Tabla XV. Se observa una potente acción inhibitoria de la algesia inducida por calor, produciéndose los mayores porcentos de inhibición a las 2 horas de administración.

El efecto es potente a las 3 horas, y aunque las dosis de 2,5 y 7,5 mg/kg tienen un comportamiento similar al control positivo, es la dosis mayor la que mantiene el efecto más prolongado en el tiempo y superior a la codeína.

Tabla XV. Efecto de la administración del veneno de *R. juncus* en el modelo del plato caliente.

Grupo	Dosis (mg/kg)	% de Inhibición	
		2 h	3h
Control	-	26,52 a	16,76 a
Veneno de <i>R. juncus</i>	2,5	173,96 b	92,53 b
	5,0	109,19 c	36,31 a
	7,5	145,55 bc	165,54 c
Codeína	40	120,35 c	94,17 b

Grupos con al menos una letra común, no difieren estadísticamente ($p > 0,05$)

Los resultados del plato caliente evidencian que el veneno de *R. juncus* juega un papel antinociceptivo a niveles del sistema nervioso central superiores a la médula espinal puesto que la respuesta de lamido y salto requiere de una mayor y más compleja integración neuronal.

Tabla XVI. Potencial pro-oxidante del veneno del escorpión *R. juncus* en el modelo de daño al ADN inducido por *Fenantrolina*/ Cu^{2+} .

Sustancia de prueba	Concentración (mL)	Magnitud del daño al ADN (DO a 532 nm; Media ± DE)
Control negativo	-	0,069 ± 0,004
veneno del escorpión <i>R. juncus</i>	7,50	0,023± 0,009*
	18,70	0,036 ± 0,002*
	37,50	0,047± 0,003*
	56,20	0,069 ± 0,012
	75,00	0,075 ± 0,011
Ácido ascórbico	200 µM	0,130 ± 0,006*

Letras diferentes significan diferencia estadística (p < 0,05) respecto al control
Tabla XVII. Potencial pro-oxidante del veneno del escorpión *R. juncus* en el modelo de daño al ADN inducido por *Bleomicina/Fe³⁺*.

Sustancia de prueba	Concentración (µg/mL)	Magnitud del daño al ADN (DO a 532 nm; Media ± DE)
Control negativo	-	0,040 ± 0,005
veneno del escorpión <i>R. juncus</i>	4,50	0,024 ± 0,006
	9,01	0,026 ± 0,010
	18,02	0,037 ± 0 ,008
	36,04	0,024 ± 0,001
	90,11	0,039 ± 0,001
Ácido ascórbico	200 µM	0,647 ± 0,016*

5

Letras diferentes significan diferencia estadística (p < 0,05) respecto al control
Tabla XVIII. Células empleadas en los estudios de evaluación de la actividad biológica *in vitro* del veneno de escorpión *R. juncus*.

Líneas celulares	Forma de crecimiento	CC ₅₀ (mg/mL)
HeLa (carcinoma de cérvix humano)	monocapa	1
HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humano)	monocapa	0,78
NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano)	monocapa	0,69
A549 (carcinoma de pulmón humano)	monocapa	0,62
U937 (linfoma histiocítico humano)	suspensión	ND
L929 (fibrosarcoma murino)	monocapa	1,3
S-180 (sarcoma murino)	suspensión	ND
F3II (adenocarcinoma mamario murino)	monocapa	1,2
MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano)	Monocapa	2,2
Vero (células normales de riñón de mono verde africano)	Monocapa	ND
MDCK (células normales de riñón de perro)	monocapa	ND
N ₂ A (células de neuroblastoma murino)	monocapa	1,4
Macrófagos (extraídos del peritoneo en ratones Balb/c)	-	ND
Linfocitos (extraídos del bazo de ratones Balb/c)	suspensión	ND

ND: No determinado CC₅₀: concentración citotóxica media

5 Los cultivos celulares que crecen en monocapa (carcinomas) mostraron una inhibición significativa del crecimiento celular ($p < 0.05$) y mayor sensibilidad que las células normales y las células tumorales que crecen en suspensión.

10 La comparación de la CC₅₀ de la línea celular normal humana MRC-5 con las células tumorales humanas mostraron que el veneno del escorpión *R. juncus* presenta una diferencial y significativa citotoxicidad ($p < 0.05$) hacia las células tumorales con respecto a las células normales (Tabla XVIII).

La exposición del veneno, provocó una inhibición significativa del crecimiento ($p < 0.05$), en las líneas celulares tumorales humanas y murinas que crecen en monocapa. Las líneas celulares tumorales U937 y S-180 (ambas crecen en

suspensión) se mostraron menos sensible a la aplicación del veneno, la afectación sólo se tradujo en una ligera disminución del crecimiento (Tabla XVIII).

Las celulares normales, los linfocitos y macrófagos peritoneales mostraron menor sensibilidad que las células tumorales. No se observaron efectos tóxicos significativos ($p>0.05$) en todo el espectro de concentraciones empleadas (Tabla XVIII).

La evaluación de la incidencia de las metástasis pulmonares al cabo de 50 días demostró, que la administración del veneno de escorpión provocó una reducción significativa (0,8 mg/kg; 3,2 mg/kg) en la aparición de metástasis espontáneas en los pulmones (Tabla XIX).

Tabla XIX. Incidencia de la aparición de metástasis pulmonares en ratones Balb c implantados con el tumor mamario murino F3II. *diferencias estadísticamente significativa con respecto al control ($p<0,05$).

Grupo	Cantidad de ratones	Incidencia metástasis	# nódulos Metástasis (rango)
Control	6	4/6 66%	0-7
0,2 mg/kg	7	5/7 71%	0-7
0,8 mg/kg	5	2/5 42%	0-2*
3,2 mg/kg	5	2/5 42%	0-3*

Vía de administración oral

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de adenocarcinoma mamario implantado en ratones Balb c. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al control se administró solución salina y todas las administraciones se realizaron por vía oral durante 35 días. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días.

Los grupos experimentales tratados con el veneno del escorpión mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p<0.05$) cuando se compararon con el grupo control (Figura 4). Los grupos experimentales mostraron una relación dosis

respuesta durante los 35 días de evaluación, con respecto al retardo de la progresión tumoral.

5 Tabla XX. Tiempo de sobrevida promedio de los grupos experimentales implantados por vía intraperitoneal con 10⁶ células de S-180/ratón y tratados con el veneno del escorpión *R. junceus* por vía oral.

Dosis	control	6 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
Tiempo de Sobrevida (días)	20	20,5	24	22,5	20

10 Tabla XXI. Porciento de sobrevida de los grupos experimentales implantados por vía intraperitoneal con 10⁶ células de S-180 y tratados con el veneno del escorpión *R. junceus* por vía oral.

Dosis	Control	6 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
sobrevida (%)	0	26	37	22	0

15 La dosis de 12,5 mg/kg mostró el mayor tiempo de vida media (24 días), seguido por la dosis de 25 mg/kg (22,5 días) y la dosis de 6 mg/kg (20,5 días) mientras los controles mostraron un tiempo de vida media de 20 días (Tabla XXI). De igual forma la dosis de 12,5 mg/kg evidenció los mayores porcentos de sobrevida cuando murió el 100% de los ratones en el grupo control (Tabla XXI), mientras que 6 mg/kg y 25 mg/kg mostraron 26% y 22% respectivamente. A pesar de estos resultados el
20 incremento del tiempo de sobrevida y los porcentajes de sobrevida en los tres grupos experimentales (6 mg/kg, 12,5 mg/kg y 25 mg/kg) no fueron estadísticamente

significativos. La dosis de 50 mg/kg mostró valores similares al control en todos los casos.

Ensayo de actividad antiproliferativa de las fracciones obtenidas en cromatografía de exclusión molecular

5 El efecto de las fracciones proteicas sobre el crecimiento celular se determinó de forma similar al ejemplo 6. En el estudio se emplearon 2 líneas celulares tumorales: HeLa, (carcinoma de cérvix humano) A549 (carcinoma de pulmón humano) y la línea celular normal MRC-5, (fibroblastos de pulmón humano). Las fracciones quedaron a concentración final entre 9 µg/mL-600 µg/mL en los pocillos.

10 La evaluación de la citotoxicidad de las fracciones en las líneas celulares evidenció una inhibición del crecimiento en las células tumorales y escasa toxicidad en la célula normal para las fracciones LB-03 y LB-04. La tabla XXII muestra la CC₅₀ para cada una de las fracciones provenientes de la purificación.

Tabla XXII. Pesos moleculares relativos y concentración citotóxica media de las
15 fracciones obtenidas en cromatografía de exclusión molecular sobre líneas celulares tumorales y normales.

Fracciones del veneno de <i>R. juncus</i>	Pesos moleculares relativos*	Concentración citotóxica media (CC ₅₀) (µg/mL)		
		HeLa	A549	MRC-5
LB-01	30 kDa-72 kDa	835,3	420	245,1
LB-02	14 kDa-30 kDa	208,7	250	276,9
LB-03	4 kDa-8 kDa	140,1	116,6	439,2
LB-04	≤4 kDa	423,6	283	613,9

*pesos moleculares relativos determinados a partir de la curva de calibración log PM vs V₀/V_e. PM: pesos moleculares de las proteínas patrones. V₀: Volumen muerto de
20 la columna. V_e: volumen de elusión de cada pico de proteína.

Las fracciones obtenidas en cromatografía de exclusión molecular en FPLC se corrieron en una electroforesis en geles de poliacrilamida con un gradiente entre un 4-20% para verificar la composición proteica de las mismas la cual se observa en la Fig. 7.

25 Las fracciones LB-03 y LB-04 presentan una composición de proteínas de bajo peso molecular y adicionalmente fueron las fracciones que mostraron mayor citotoxicidad

sobre células tumorales (Hela y A549) y baja toxicidad sobre células normales (MRC-5).

Estas fracciones se sometieron a una repurificación mediante cromatografía líquida de alta resolución empleando una columna C18 analítica de fase reversa. Como fase móvil se emplearon dos soluciones: solución A (0,12% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua) y solución B (0,10% de TFA en acetonitrilo). La elución de los componentes de las fracciones se realizó bajo un gradiente escalonado de 0 hasta 70% de la solución B en 70 minutos a un flujo de 0,5 ml/min y se detectaron a una longitud de onda de 220nm. Los péptidos puros obtenidos se evaluaron en células tumorales (Hela) y normales (CHO) de forma similar a como se describe en el ejemplo 6 y se determinaron el peso molecular y la secuencia proteica mediante espectrometría de masas acoplado a un equipo de cromatografía líquida de alta resolución.

Se obtuvieron ocho péptidos RjLB-01, RjLB-03, RjLB-04, RjLB-05, RjLB-07, RjLB-08, RjLB-09 y RjLB-14 con elevada actividad citotóxica sobre células tumorales y escasa toxicidad sobre las células normales. Estos resultados corroboran lo observado para el caso del veneno completo y confirma la toxicidad preferencial de los componentes del veneno sobre las células tumorales.

A partir de la purificación de los componente activos se determinaron las proporciones a las que se encuentran en el veneno (Tabla XXIII).

Tabla XXIII. Proporción de los principios activos dentro de la composición del veneno y rango de la actividad biológica in vitro sobre células tumorales.

Principio activo	proporción en el veneno (%)	Rango de actividad biológica in vitro (%)
RjLB-01	1,5-2,0	0,945 -1,89
RjLB-03	8-9	4,5 - 9
RjLB-04	0,5-1,0	0,445 - 0,89
RjLB-05	0,5-0,7	0,33-0,71
RjLB-07	0,5-0,8	0,5-1,0
RjLB-08	0,5-1,0	1,5-3,0
RjLB-09	0,3-0,6	3,65-4,1
RjLB-14	0,4-0,8	3,5-6,0

Para los péptidos RjLB-01, RjLB-03 y RjLB-04 se obtuvieron pesos moleculares de 908 Da, 1964 Da y 4748,14 Da respectivamente. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos de péptidos de venenos de escorpión y no se encontró homología con péptidos anteriormente descritos lo que evidencia

adicionalmente la novedad de los resultados.

Otro objeto de la presente invención es la formulación obtenida de la siguiente forma. Se tomaron entre 50-100 escorpiones de la especie *Rhopalurus junceus* a los cuales se les extrajo el veneno por estimulación eléctrica y se diluyó en 10-20 mL de agua destilada. Posteriormente se clarificó por centrifugación a 10 000 rpm durante 15 min. Para eliminación de constituyentes como mucus y debris celular. Al mismo se le realizó la determinación de proteínas a través del método de Lowry, mostrando una concentración entre 5-15 mg/mL. A continuación el veneno de escorpión se diluye convenientemente empleando el agua destilada como único excipiente para obtener una formulación con un rango de concentración entre 0,05-0,1 mg/mL.

Breve descripción de las figuras.

En la Fig.1 se observa el comportamiento de la codeína (control positivo), fármaco analgésico central cuyo tiempo de vida media oscila entre las 2 y 3 horas, lo cual está en correspondencia con nuestros resultados.

La Fig. 2. muestra la electroforesis en geles de agarosa (1.5 %), del ADN extraído de las líneas celulares tumorales A549 y Hela. El veneno se aplicó a concentración final de 0.5 mg/mL por pocillo. El ADN de cada línea celular se extrajo a las 24h y 48h.

Carril M: Marcador de peso molecular Lambda DNA /Hind III;

Carril 1-3: Línea celular A549; 1: ADN control sin veneno, 2: ADN extraído a las 24h, 3: ADN extraído a las 48h.

Carril 4-6: Línea celular Hela; 4: ADN control sin veneno, 5: ADN extraído a las 24h, 6: ADN extraído a las 48h.

La figura Fig. 3. muestra la cinética de crecimiento tumoral en los grupos experimentales. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días. La inhibición del crecimiento tumoral fue dependiente de las dosis de veneno empleadas. Significación estadística con respecto al control *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

La Fig. 4. muestra la cinética de crecimiento tumoral en los grupos experimentales. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días. La inhibición del crecimiento tumoral fue dependiente de las dosis de veneno empleadas. Significación estadística con respecto al control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

- 5 La Fig.5 muestra el efecto de la administración oral del veneno de escorpión sobre la incidencia de las metástasis experimentales en pulmón. Diferencia estadísticamente significativa ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La Fig. 6. muestra el perfil cromatográfico del veneno de escorpión *R. juncus* en cromatografía líquida de baja presión empleando una columna de exclusión molecular Superosa 12 HR10/30.

- 10 La Fig. 7. muestra la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, Se aplicaron las fracciones obtenidas en la purificación mediante cromatografía líquida de baja presión. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carril 2: Veneno Total; Carril 3: Fracción LB-01; Carril 4: Fracción LB-02; Carril 5: Fracción LB-03; Carril 6: Fracción LB-04.

La Fig.8. muestra la curva de concentración-respuesta de los péptidos puros obtenidos de la repurificación de las fracciones evaluadas. La evaluación se realizó sobre las células tumorales Hela (carcinoma de cérvix humano). Las concentraciones empleadas estuvieron de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ -400 $\mu\text{g/mL}$.

- 20 La Fig.9.muestra la curva de concentración-respuesta de los péptidos puros obtenidos de la repurificación de las fracciones evaluadas. La evaluación se realizó sobre las células no tumorales CHO (células de ovario de Hamster chino). Las concentraciones empleadas estuvieron de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ -800 $\mu\text{g/mL}$.

EJEMPLOS DE REALIZACION

- 25 **Ejemplo 1** Modelo de inflamación aguda por inducción de edema auricular en ratón por aceite de croton.

Se utilizaron ratones OF1, machos, peso promedio 18-22 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

- 30 Se desarrolló la metodología descrita en el CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Lima. Noviembre 1996). Se utilizó una solución de aceite de croton en acetona al 0,5%. La dexametasona se disolvió en CMC al 0,5%.

Ejemplo 2 Modelo de implantación de tacos de algodón en ratas.

Se utilizaron Ratas Sprague-Dawley con 180 g de peso corporal procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Se empleó el método de implantación de tacos de algodón citado en el CYTED
 5 (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Lima. Noviembre 1996),

La inflamación es la respuesta del tejido frente a un daño. Esto involucra la participación y activación de enzimas, liberación de mediadores, extravación de fluido, migración celular así como ruptura y reparación de los tejidos (Vane 1995).

10 Es bien conocido que el efecto antiinflamatorio puede estar dado por una variedad de agentes químicos y que existe una pequeña correlación entre su actividad farmacológica y estructura química (Sertie 1990) Esto, asociado con la complejidad del proceso inflamatorio hace necesario el uso de diferentes modelos experimentales para llevar a cabo un ensayo farmacológico. El modelo del
 15 granulosa por pellets de algodón en ratas es un ensayo utilizado frecuentemente para estudiar el efecto sobre inflamaciones crónicas. (Elieter 1999) Se ha demostrado que hay tres fases de inflamación después de la implantación del pellet, la última fase pertenece a la proliferación celular que ocurre entre el tercer y sexto día, esta fase puede ser inhibida por antiinflamatorios esteroideos como la
 20 dexametasona y por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (Sw 1972).

Transcurridos los 7 días de haberse implantado los pellets de algodón los animales fueron sacrificados por el método de eutanasia correspondiente y los pellets extraídos y procesados. La diferencia entre el peso final e inicial del pellet fue considerado como el tejido granulomatoso producido.

25 Ejemplo 3 Modelo de Angiogénesis inflamatoria

Se emplearon ratas Sprague Dawley machos, procedentes del CENPALAB con un peso corporal entre 180-240 g.

La angiogénesis inflamatoria es un proceso complejo que involucra una serie de mecanismos moleculares diferentes en muchos aspectos pero básicamente
 30 semejantes en que se desarrollan mediante una cascada angiogénica.

Después de un período de 6 días de haber sido inducida la formación del granuloma, este se observó bien definido y palpable en el grupo control, lo cual se corresponde

con los resultados reportados por Primelles en 2001. En el caso de los animales tratados con las dosis de veneno, los granulomas eran de menor tamaño al tacto y al observarlos macroscópicamente tenían los bordes con menor definición y estaban menos adheridos a la epidermis.

5 **Ejemplo 4. Actividad analgésica**

- Modelo de inducción de contorsiones por ácido acético en ratones,

Se procedió según la metodología descrita en CYTED.

Se utilizaron ratones OF1, machos, peso promedio 20-25 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

10

Administración vía intraperitoneal

Las dosis de 1; 2,5; 5 y 7,5 mg/kg de veneno de *R. junceus* fueron inoculados por vía intraperitoneal. Treinta minutos después se les administró a los animales de experimentación, vía ip, 0,1 mL de una solución de ácido acético al 3% y se registraron el número de contorsiones/animal durante 10 minutos a partir de la primera contorsión observada.

15

Administración vía oral

Las dosis de 1, 5, 10, 15, 20 y 50 mg/kg de veneno de *R. junceus* administrados por vía oral. Una hora después se les administró a los animales de experimentación, vía ip, 0,1 mL de una solución de ácido acético al 3% y se registraron el número de contorsiones/animal durante 10 minutos a partir de la primera contorsión observada.

20

Ejemplo 5. Evaluación de la actividad antioxidante

Se evaluó la actividad anti-oxidante *in vitro* del veneno de *Rhopalurus junceus*, a través del efecto protector del ADN frente a procesos oxidativos en los sistemas Cobre-Fenantrolina y Bleomicina-Hierro. El veneno demostró tener actividad antioxidante al proteger al ADN de los procesos de peroxidación.

25

En los sistemas Cobre-Fenantrolina y Bleomicina-Hierro se observó que el derivado de *Rhopalurus junceus* presente en las formulaciones descritas con anterioridad no ejerce efecto pro-oxidante sobre el ADN. Los valores de absorbancia obtenidos con las diferentes concentraciones del derivado de *Rhopalurus junceus*, son inferiores a los obtenidos con el control positivo. Los resultados de dicha evaluación se muestran en las Tablas XVI y XVII.

30

Ejemplo 6. Citotoxicidad in vitro en un panel de células tumorales y normales

■ El efecto del veneno sobre el crecimiento celular, se detectó por el ensayo del MTT, el cual mide la proliferación celular debido a la reducción metabólica de esta sal de tetrasolio (amarillo), por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. El compuesto resultante (azul de formazán) puede ser solubilizado y cuantificado espectrofotométricamente.

En el estudio se emplearon 9 líneas celulares tumorales: HeLa (carcinoma de cérvix humano), HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humano), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), U937 (linfoma histiocítico humano), L929 (fibrosarcoma murino), S-180 (sarcoma murino) y F3II (adenocarcinoma mamario murino). De igual forma se emplearon 3 líneas celulares normales: MRC-5, (fibroblastos de pulmón humano), Vero (células normales de riñón de mono verde africano) y MDCK (células normales de riñón de perro). Se evaluaron además: Macrófagos peritoneales (extraídos del peritoneo de ratones Balb/c) y Linfocitos (extraídos del bazo de ratones Balb/c). Las células fueron crecidas en frascos de cultivo en medio mínimo esencial (MEM) ó medio RPMI-1640, según las características del cultivo celular, suplementados con 2 mM de glutamina, aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina-estreptomicina 100UI/mL – 100 µg/mL. Cada una se incubó en atmósfera húmeda a 37°C a 5% de CO₂ hasta formación de monocapa. Cada línea celular se desprendió por tratamiento con una solución de tripsina-EDTA 0,25 % y se prepararon a concentración de 2 x 10⁵ células/mL, después de ser contadas en cámara de Neubauer.

El ensayo se realizó en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos, para cultivos celulares (*Corning Inc. Costar^R*). En cada pocillo se adicionó 50 µL de cada línea celular y se incubaron en atmósfera de 5% CO₂ a 37°C durante 24h. Al cabo de este tiempo se adicionaron 50 µL de medio con el veneno previamente disuelto. El veneno quedó a concentración final de 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL y 1 mg/mL en los pocillos. Todas las líneas celulares quedaron a concentración final de 10⁴ células/pozo. El suero fetal bovino (SFB) se empleó en el medio al 10%.

Las placas se incubaron nuevamente en atmósfera de 5% CO₂ a 37°C durante 3 días. Al cabo de este tiempo se adicionaron 10 µL de una solución estéril de MTT

(sales de tetrazolio 5 mg/mL en PBS estéril) en cada pocillo y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 4h. Finalmente el medio se decantó y se adicionó 200 μ L/pozo de solución de dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubaron a 37°C durante 30 min. en atmósfera húmeda. La densidad óptica (DO) se leyó en un lector de microplacas de *ELISA MRX Revelation Dynex Technologies* a 560 nm con 630 nm como referencia. Cada concentración de las fracciones se realizó por triplicado y se realizó 4 veces el ensayo.

Para análisis de las curvas de concentración-respuesta se graficó el porciento de proliferación celular, calculada la fórmula $(1-DO \text{ (muestra)}/DO \text{ (control)}) \times 100$ contra las diferentes concentraciones de veneno. La concentración citotóxica media se expresó como la CC_{50} , la concentración del veneno que causa el decrecimiento del 50% en el número de células viables (absorbancia del MTT) comparada con controles no tratados y aparece expresada en la tabla XV para cada una de las células evaluadas.

15 **Ejemplo 7. Estudio de apoptosis**

Se realizó el estudio de determinación de apoptosis mediante fragmentación de ADN. Se emplearon las líneas celulares Hela y A549. Los resultados se observan en la Figura 2. La fragmentación del ADN, característico de la apoptosis, se observó en los carriles correspondientes a las células Hela tratadas con el veneno, mientras que en los pocillos controles y en la línea celular A549 se observó una única banda correspondiente al ADN cromosomal intacto. Estos resultados evidencian que el veneno de escorpión puede inducir la muerte celular por ambos mecanismos apoptosis y necrosis.

25 **Ejemplo 8. Actividad antitumoral tumores sólidos. Modelo Experimental de adenocarcinoma mamario F3II. Vía de administración intraperitoneal.**

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de adenocarcinoma de mamas implantado en ratones Balb c. Se emplearon 3 dosis para los grupos de tratamiento (0,2 mg/kg, 0,8 mg/kg, y 3,2 mg/kg), al control se administró solución salina todos por vía intraperitoneal. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días. Al cabo de 50 días a partir de la implantación del tumor se sacrificaron los animales, se les extrajo los pulmones y se analizó la aparición de metástasis pulmonares.

Los grupos experimentales tratados con el veneno del escorpión mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p < 0.05$) cuando se compararon con el grupo control (Figura. 3). Los grupos experimentales mostraron una relación dosis respuesta durante los 35 días de evaluación, con respecto al retardo de la progresión tumoral. La disminución significativa de la progresión tumoral encontrada en los grupos tratados, indica que el veneno del escorpión *R. junceus* tiene efecto antitumoral al afectar el crecimiento del tumor al menos durante el período de evaluación. **Ejemplo 9**

Modelo Experimental de adenocarcinoma mamario F3II.

10 Vía de administración oral.

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de adenocarcinoma de mamas implantado en ratones Balb c. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al control se administró solución salina todos por vía oral. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días.

Los grupos experimentales tratados con el veneno del escorpión (12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg) mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p < 0.05$) cuando se compararon con el grupo control (Figura. 4). La disminución significativa de la progresión tumoral encontrada en los grupos tratados, indica que el veneno del escorpión *R. junceus* tiene efecto antitumoral al afectar el crecimiento del tumor al menos durante el período de evaluación.

Ejemplo 10

Actividad antimetastásica. Modelo Experimental de metástasis pulmonares

25 Se evaluó el efecto del veneno del escorpión sobre las metástasis pulmonares en un modelo de adenocarcinoma mamario implantado en ratones Balb/c. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al control se administró solución salina. Al cabo de 24 h de implantación del tumor en los pulmones por vía intravenosa, se comenzaron los tratamientos los que se realizaron diariamente en el horario de la mañana durante 21 días. Al cabo de 24 horas después de la última administración todos los grupos experimentales fueron sacrificados por dislocación cervical, los pulmones fueron extraídos para análisis de la ocurrencia de metástasis.

En todos los casos la incidencia del tumor fue del 100%. El grupo experimental administrado con 6 mg/kg mostró niveles superiores al control con relación a la ocurrencia de metástasis. Los grupos experimentales tratados con la dosis de 25 mg/kg evidenciaron una disminución de la ocurrencia de metástasis comparados con el control sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El grupo experimental tratado con las dosis de 12,5 mg/kg y 50 mg/kg mostraron una reducción estadísticamente significativa de la ocurrencia de metástasis cuando se comparó con el control (Figura 5).

Ejemplo 11

10 Actividad antitumoral tumores ascíticos. Modelo Experimental de Sarcoma (S-180)

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de Sarcoma murino implantado en el peritoneo en ratones NMRI. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al grupo control se administró solución salina. El veneno se administró 24h después de implantado el tumor diariamente hasta la mortalidad del 100% de todos los grupos experimentales. La tabla XX muestra los resultados del tiempo de sobrevida de los animales tratados y los controles. La tabla XXI muestra los porcentos de sobrevida de los grupos experimentales.

Ejemplo 12

20 Purificación e identificación de proteínas del veneno como principios activos.

Para realizar el fraccionamiento del contenido proteico total, el veneno total se disolvió en acetato de amonio 0.1 M (NH₄Ac) y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se aplicó en un equipo de cromatografía líquida de baja presión AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) implementado con una columna de gel filtración Superosa12 HR 10/30, con dimensiones 10 x 300 mm. La columna se equilibró con 0.1 M de NH₄Ac y el material eluyó en el mismo solvente a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La absorbancia se monitoreó a una densidad óptica (DO) de 280 nm durante 72 min. La columna de exclusión molecular Superosa 75 HR 10/30 se calibró mediante un Kit de proteínas patrones: ribonucleasa A (13,7Kda), quimotripsinógeno (25Kda), ovoalbúmina (43Kda), albúmina (67Kda) y azul dextrana 2000. Se realizó una curva patrón para determinar los pesos moleculares relativos de las diferentes fracciones de proteínas obtenidas

durante la cromatografía. Los resultados de las corridas cromatográficas se observan en la Fig.6.

Ejemplo 13

Estudios clínicos de la formulación en pacientes humanos con cáncer.

5

El objetivo del estudio fue la evaluación de la calidad de vida en pacientes oncológicos. Para la inclusión de los sujetos de estudio se utilizaron pacientes de ambos sexos con confirmación histológica de cáncer en cualquier estadio. Se elaboró un documento que contenía el acta el consentimiento informado del paciente y el resumen de historia clínica expedido por el oncólogo de base. En el documento se incluyó la evaluación del comportamiento clínico de los pacientes la cual se siguió a través de la evolución clínica realizada por los facultativos en su hospital de base. La periodicidad del seguimiento fue de al menos dos meses. El seguimiento se realizó durante 1 año. Se preparó la formulación en frascos con volúmenes de 40 mL con concentraciones entre 0,05-0,1 mg/mL. El frasco se diluyó en agua destilada empleada como excipiente hasta completar 1 litro. La administración del producto se realizó diariamente por vía oral y las dosis recomendadas fueron dependientes del estadio del paciente y el diagnóstico histológico.

10

15

20

25

30

Se incluyeron un total de 100 pacientes en el estudio y las principales localizaciones evaluadas fueron cáncer de mama, próstata, colon, pulmón, cerebro y páncreas. La administración del producto en ninguno de los casos provocó reacciones adversas durante el tratamiento, correspondiéndose con lo observado en los estudios preclínicos. En todos los casos se observó aumento de la calidad de vida que incluyó mejoría de las variables clínicas fundamentales como fueron disminución o desaparición de la disnea y tos en la totalidad de los casos de los pacientes con cáncer de pulmón. Se constató en muchos pacientes mejoría radiológica por la estabilización de las lesiones, en algunos casos y desaparición de estas, en otros. Adicionalmente se logró la estabilización de las variables hematológicas y disminución del dolor y la inflamación. En mas del 50% de los pacientes tratados durante 1 año, con la formulación objeto del la invención, se superó el tiempo de sobrevida estimado para algunas de las patologías estudiadas.

Ejemplo 14.**Estudios clínicos del VIDATOX® 30 CH.**

5 El **VIDATOX® 30 CH** es un bioterápico homeopático, desarrollado en el laboratorio de homeopatía de LABIOFAM, que tiene como principio activo el veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* en dilución 30 centesimal. Su presentación es en forma de gotas en vehículo alcohólico al 33 %.

10 En estudios realizados en 174 pacientes de ambos sexos con tratamientos oncoespecíficos se demostró el efecto adyuvante del **VIDATOX® 30 CH** en el tratamiento del cáncer en diferentes localizaciones (pulmón, próstata, mama, colon, páncreas, t. linfóide, cerebro, recto, etc.). Sus resultados señalan que el 96% de los pacientes administrados tuvieron una supervivencia mayor de 12 meses, que el 90% reportaron mejorías de los síntomas clínicos motivos de consulta y que el dolor en 63 de estos pacientes (como síntoma predominante) en el 62% de los casos
15 evolucionó hacia una forma moderada que no requería necesariamente tratamiento para su alivio, que el 27% manifestaron ausencia de dolor y que en ninguno de los casos reportó reacciones adversas relacionadas con el tratamiento.

REIVINDICACIONES

- 1) Péptido nombrado RjLB-01, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 544.42 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID No.1
- 2) Péptido nombrado RjLB-03, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 1964.0 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID No.2
- 3) Péptido nombrado RjLB-04, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 4748.14 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ.ID No.3
- 4) Péptido nombrado RjLB- 05, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 908.0 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No.4
- 5) Péptido nombrado RjLB-07, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 707.03 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No. 5.
- 6) Péptido nombrado RjLB-08, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 712.42 da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No.6.
- 7) Péptido nombrado RjLB-09, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 1203.44 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID. No. 7.
- 8) Péptido nombrado RjLB-14, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 5930.45 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID. No 8
- 9) Composiciones farmacéuticas, que son obtenidas, a partir del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*, caracterizadas por poseer péptidos como principios activos con elevada actividad citotóxica sobre células tumorales, mezcladas con agua destilada como excipiente.
- 10) Composiciones farmacéuticas según reivindicación 9, procesadas homeopáticamente.
- 11) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 9 que contienen al menos un péptido según las reivindicaciones de la 1 a la 8, que presenta actividad antitumoral, dicho péptido seleccionado presenta cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas.
- 12) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 11 caracterizada por poseer una mezcla de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Rophalurus junceus* en las concentraciones siguientes: RjLB-01 en un rango del 1,5-2,0%;

RJLB-03 en un rango del 8-9 %; RJLB-04 en un rango del 0,5-1,0 %; RJLB-05 en un rango 0,5-0,7%; RJLB-07 en un rango de 0,5-0,8 %; RJLB-08 en un rango del 0,5-1,0%; RJLB-09 en un rango del 0,3-0,6 %; RJLB-14 en un rango del 0,4- 0-8 % diluidos en 10-20 ml de agua destilada.

- 5 13) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 12 procesados homeopáticamente.

14) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 9, 10, 11, 12 y 13 empleadas en formulaciones para administración por vía oral, tópica, parenteral, rectal, vaginal y aerosol.

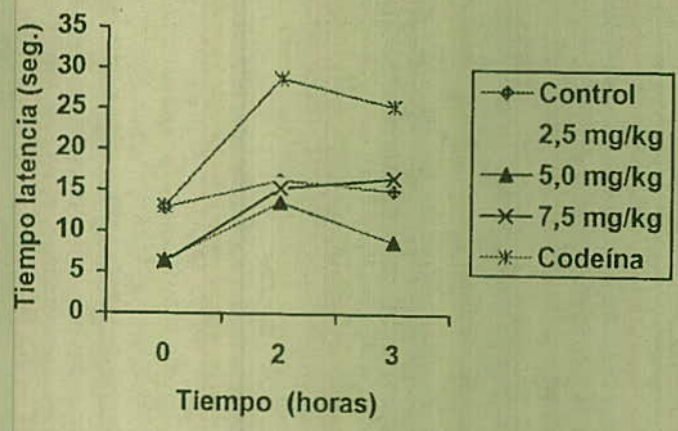


Fig.1

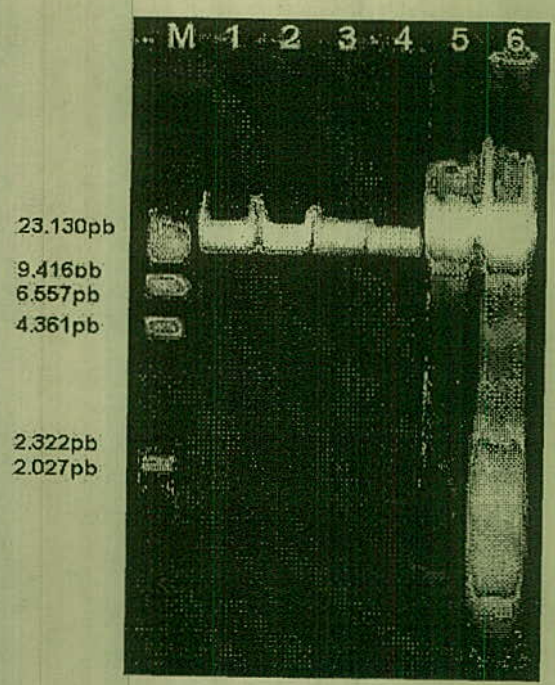


Fig. 2

Fig.3

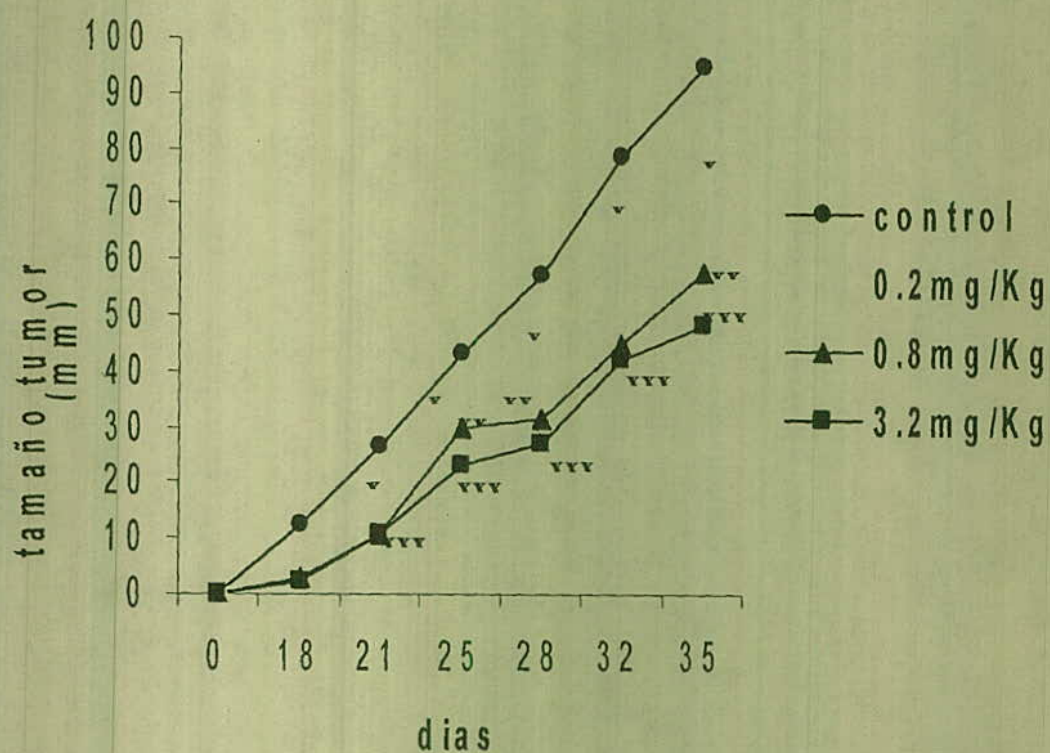
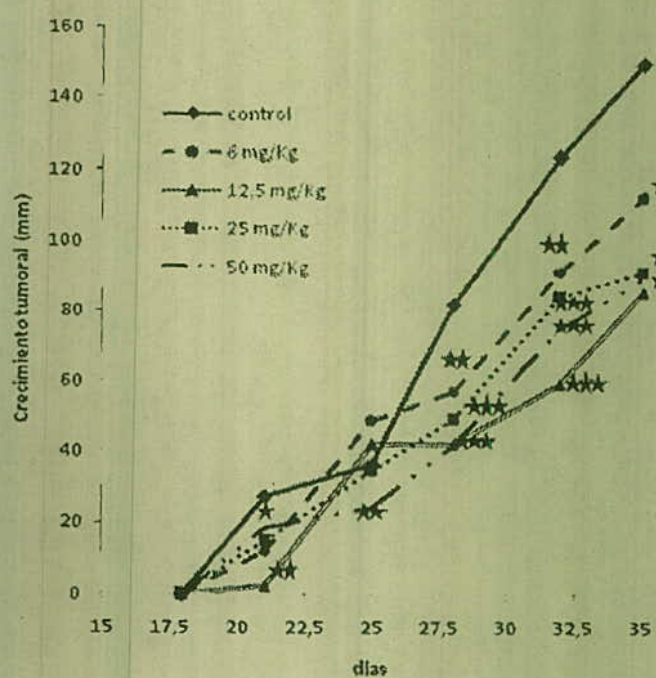


Fig. 4



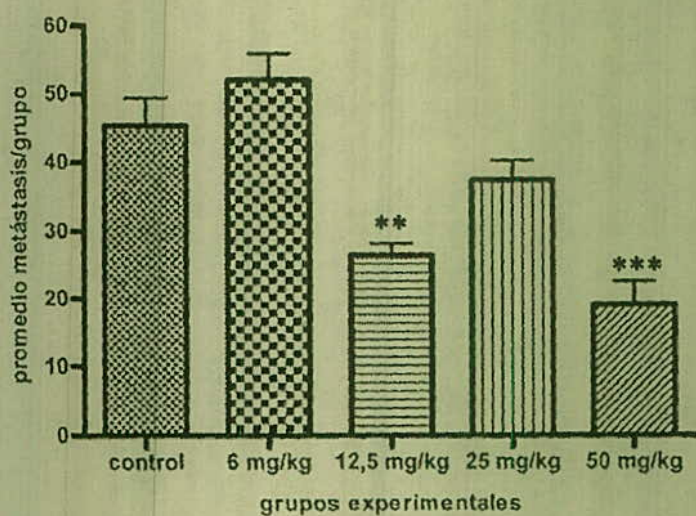


Fig. 5

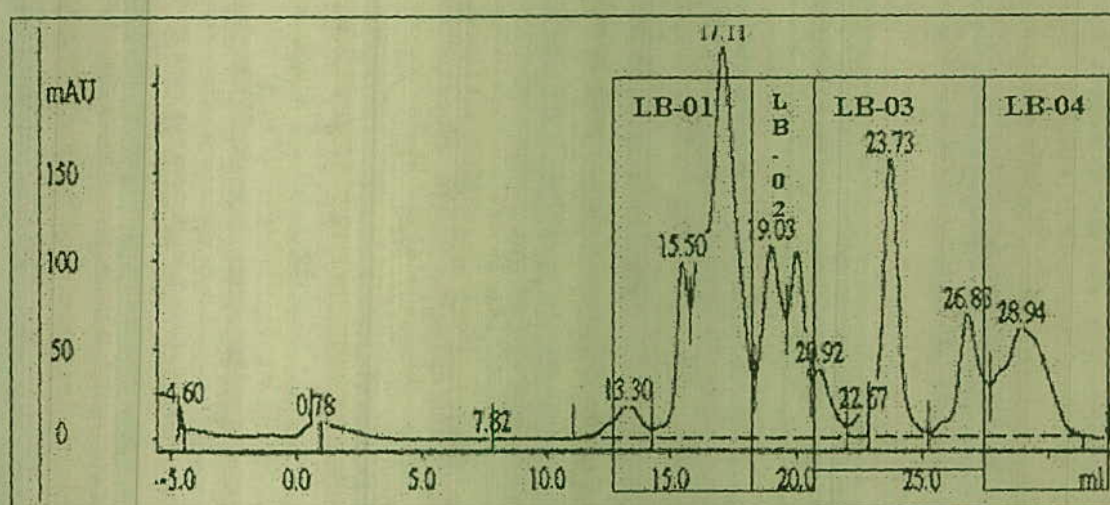


Fig. 6

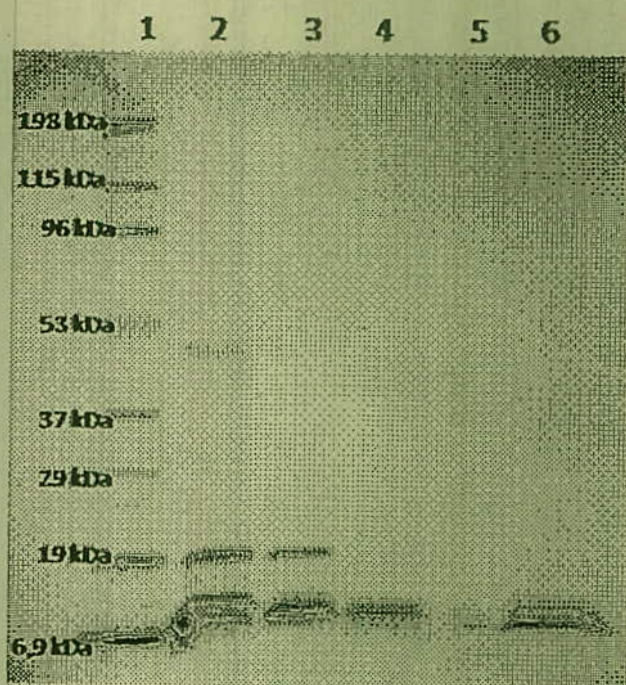


Fig. 7

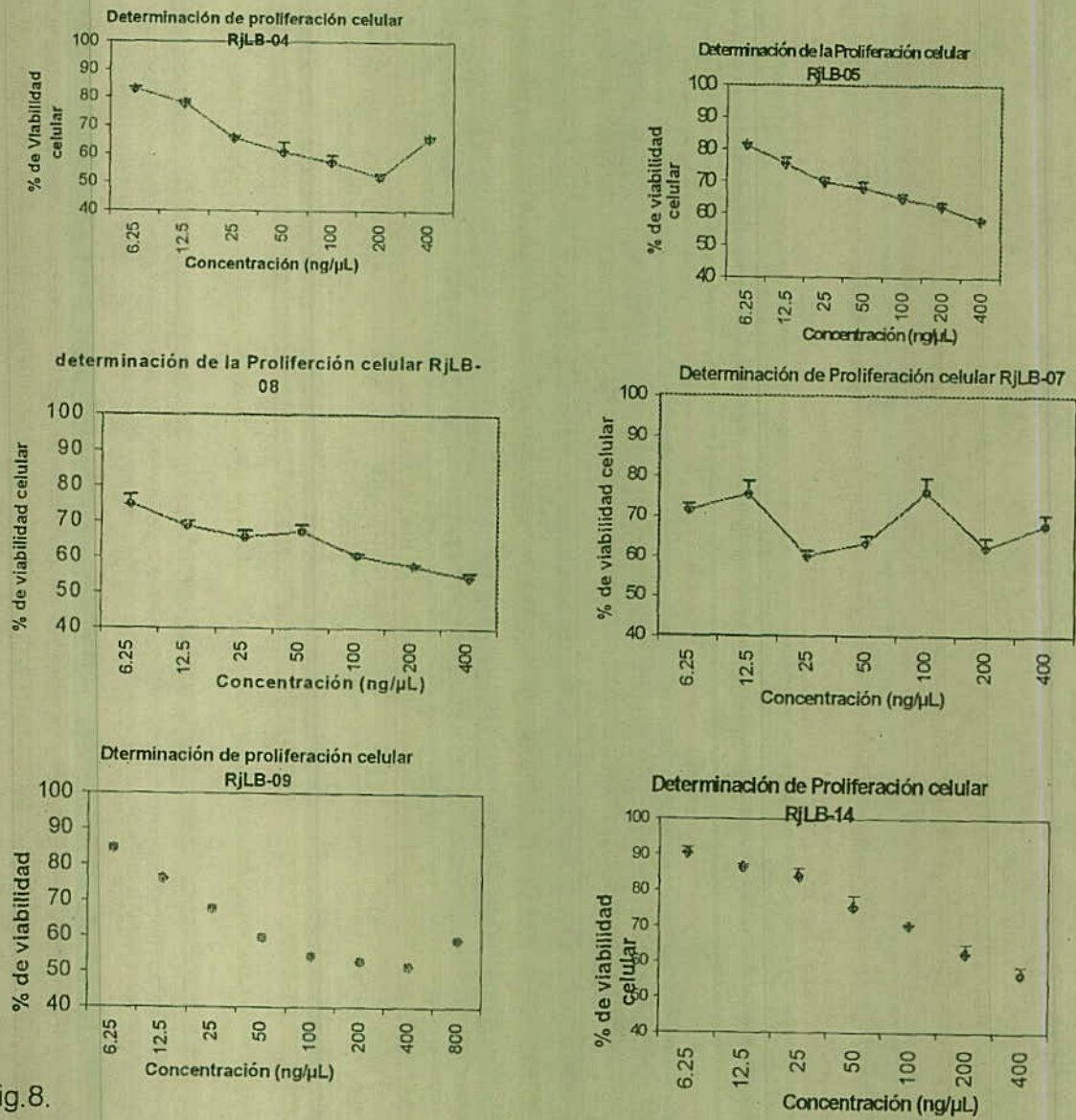
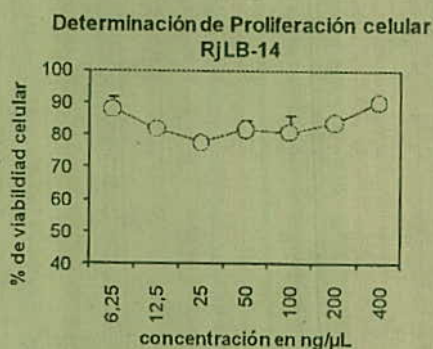
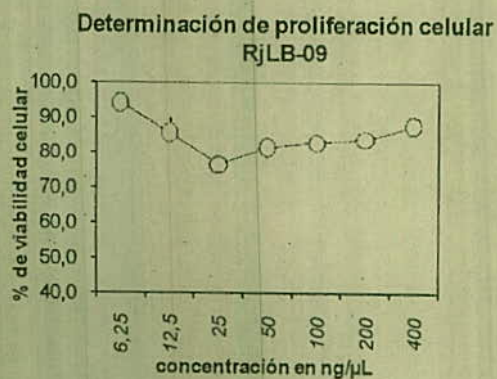
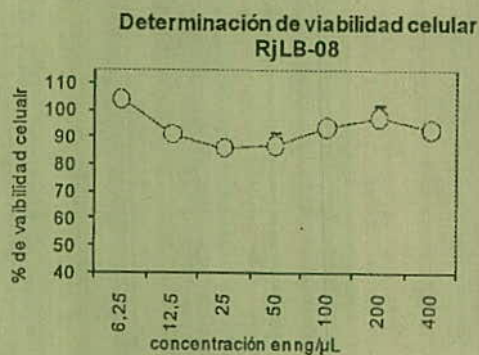
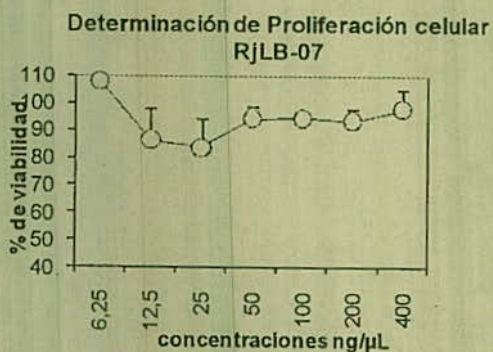
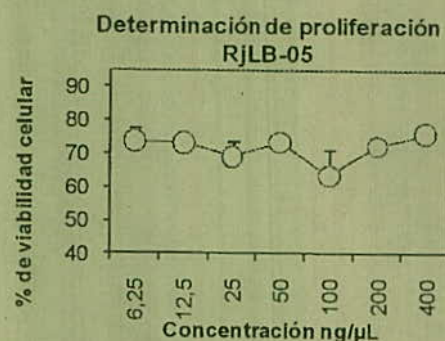
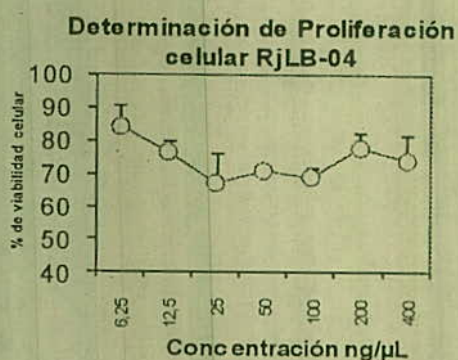
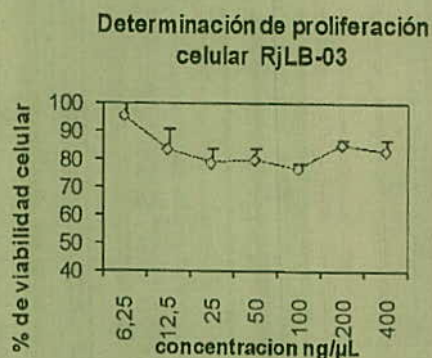
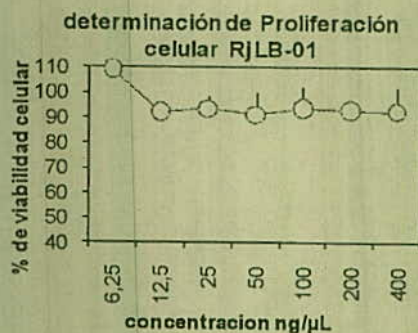


Fig.8.

Fig.9.



Sequence listing
LISTA DE SECUENCIAS

<110> Grupo Empresarial Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas

<120> Péptidos del veneno de escorpión Rhopalurus junceus y composición farmacéutica.

<130> 01-00001

<140> PCT/CU2011/000006

<141> 2011-09-27

<150> CU2010-0186

<151> 2010-09-27

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 1

Arg Thr Gly Ser Leu Leu Thr Leu Ala Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 2

Asp Leu Phe Asp Glu Leu Asp Pro Gln Lys Asp Glu Leu Asp Gln Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 3

<211> 43

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 3

Phe Glu Leu Lys Asp Leu Glu Gly Gln Thr Leu Tyr Leu Lys Asp Leu
1 5 10 15

Glu Gly Lys Thr Cys Ser Gly Gly Glu Leu Asp Lys Glu Glu His Cys
20 25 30

Gly Gly Asn Glu Leu Asp Ser Gln Gly Phe Asn
35 40

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

Sequence listing

<400> 4

Met Leu Leu Asp Asn Val Gly Phe
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 5

Asp Met Gly Ala Leu Leu Ser
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 6

Phe Asp Glu Thr Ala Lys Asp Glu Leu Leu Gly Phe Leu Gly Leu Phe
1 5 10 15

Asn

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 7

Leu Pro Cys Ala Leu Asn Asp Gly Gly Leu Cys Lys
1 5 10

<210> 8

<211> 50

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 8

Val Met Gln Asp Gln Tyr Leu Ile Ile Asn Gly Val Trp Ser Ile Val
1 5 10 15Phe Phe Leu Glu Val Ser Ile Leu Val Ile His Ile Phe Leu Leu Arg
20 25 30Glu His Glu Val Phe Val Val Arg Arg Gly Asp Glu Thr Ala Lys Asp
35 40 45Glu Leu
50

**PÉPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPIÓN RHOPALURUS JUNCEUS Y
COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA.**

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona fundamentalmente con las industrias
5 farmacéutica, y en particular con la identificación de péptidos obtenidos del
veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*, de la familia *Buthidae*, género:
Rhopalurus, especie: *R. junceus*, nombre vulgar: Alacrán "colorado" que
contiene una mezcla de péptidos, proteínas, aminoácidos y aminos libres.

Arte previo

10 Los escorpiones son artrópodos terrestres y entre los animales ponzoñosos
constituyen el grupo más antiguo pues fueron los primeros que aparecieron
en la tierra. Existen aproximadamente más de 1500 especies de escorpiones
los cuales han sido ubicados taxonómicamente en el orden Escorpiones,
clase *Arachnida* del *Phylum Arthropoda*. En sus condiciones naturales, el
15 veneno de los escorpiones es un fluido opalescente, lechoso, con un pH
7.12, que contienen mucus, lípidos, carbohidratos, aminoácidos, sales
inorgánicas, moléculas orgánicas de bajo peso molecular y una gran
variedad de proteínas con pesos moleculares entre 3 kDa y 90 kDa las
cuales constituyen el componente mayoritario. En los últimos tiempos se han
20 incrementado las investigaciones relacionadas con los venenos de escorpión
debido a la gran variedad de péptidos presentes, los que han demostrado un
gran espectro de actividad farmacológica y por tanto invaluable
herramientas en el campo de las investigaciones biomédicas (Martin-
Eauclaire M-F, Søgøard M, Ramos C, Cestele S, Bougis PE, and Svenson B.
25 Production of active insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. *Eur. J.*
Biochem. 1994; 223:637-45; Bednarek MA, Bugianesi RM, Leonard RJ, Felix
JP. Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent
inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes.
Biochem Biophys Res Commun. 1994 Jan 28; 198(2):619-25). En este
30 sentido en los últimos años se han incrementado las publicaciones patentes y
no patentes relacionadas con la actividad de estas toxinas y sus derivados
como anti-inflamatorias (Rajendra W, Armugam A and Jeyaseelan K. Toxins
in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon* 2004 July; 44(1):1-17),
analgésicos (Guan RJ, Wang CG, Wang M and Wang DC. A

depressant insect toxin with a novel analgesic effect from scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1549(1):9–18), en el tratamiento del cáncer (Liu YF, Ma RL, Wang SL, Duan ZY, Zhang JH, Wu LJ and Wu CF. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2003; 27(2):253–8; Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *J Neurooncol.* 2005 May; 73(1):1-7) y enfermedades neurodegenerativas (Rajendra W, Armugam A and Jeyaseelan K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon* 2004 July; 44(1):1-17). Las invenciones en cuya composición está contenido el escorpión y/o su veneno abarcan una amplia variedad de formulaciones encaminadas al tratamiento del cáncer. En los documentos de patentes CN 1073480, 1993 y CN 1076858, 1993 los autores refieren la obtención de un vino que permite el tratamiento y prevención del cáncer, en ambos casos por la mezcla del escorpión y materiales provenientes de plantas y otros animales.

El escorpión representa uno de los componentes de formulaciones en forma de tabletas para el tratamiento de cáncer primario de hígado (CN 1265901, 2000 y CN 1279088, 2001) y de cápsulas que inhiben el crecimiento de células tumorales y pueden curar el cáncer en pacientes (CN 1391941, 2003). Otras patentes describen variadas formulaciones para el tratamiento del cáncer (CN 1252321, 2000; CN 1316249 2001; CN 1399979, 2003).

Por otro lado existen patentes referidas a la utilización exclusiva de toxinas, obtenidas a partir del veneno de escorpión, con actividad sobre determinados tipos de células tumorales. Los primeros trabajos con toxinas provenientes de venenos de escorpión demostraron la obtención de un péptido a partir del escorpión hebreo *Leiurus quinquestriatus*. Dicha toxina, un péptido de 4 KDa nombrada clorotoxina, tiene la capacidad de unirse a los canales de cloruro expresados en los gliomas (tumores primarios de cerebro provenientes de la glia (DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol* 1993; 264:361-369). A partir de estos descubrimientos, en 1999 Ullrich et al., describieron en la patente US 5 905 027 un método de diagnóstico y tratamiento de gliomas. Otros trabajos que toman como base la especificidad de acción de la clorotoxina sobre

determinados receptores celulares en los gliomas, mostraron que esta toxina es un marcador altamente específico para otros tipos de tumores, cuyas células presentan un origen embrionario común con las células del Sistema Nervioso Central (SNC) (Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H: Chlorotoxin, a scorpion derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. GLIA 2002; 39:162-73.). Adicionalmente recientes trabajos demostraron que además de inhibir el crecimiento "*in vitro*" de los gliomas, la clorotoxina, tiene la capacidad de impedir la invasión y diseminación de este tipo de tumores hacia zonas del cerebro no dañadas debido a su interacción específica y selectiva con las metaloproteinasas las cuales son enzimas que están relacionadas con la elevada tasa de invasividad de este tipo de cáncer (Deshane J, Garner CC and Sontheimer H: Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. J Biol Chem 2003; 278:4135-44). En 2004 aparece publicada otra patente relacionada con la actividad antitumoral de una toxina, aislada del escorpión *Buthus martensis karsh*, sobre tumores implantados en animales (EP20020774251)

En algunos casos existen una gran variedad de formulaciones que tienen la propiedad de tratar o curar el cáncer, representados por las patentes descritas, sin embargo en estos casos no se demuestra que esta cualidad sea exclusiva de algunos de los tipos de escorpiones o toxinas involucrados en la elaboración de las mismas. Por otro lado, las toxinas descritas, provenientes de los escorpiones *Leiurus quinquestriatus* no presentan actividad antitumoral *per se* como el caso de la clorotoxina y *Buthus martensis karsh*, permite el tratamiento solo de determinados tipos tumores en forma de toxinas aisladas y no como una mezcla de proteínas presentes en el veneno completo.

En Cuba existe una patente de una solución diluida del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* con actividad antitumoral demostrada empíricamente en estudios realizados. En estos trabajos se administró la solución en animales domésticos con tumoraciones espontáneas y se observó reducción del tumor, obliteración y elevada sobrevida (CU 22413 A1). La formulación de la presente invención posee propiedades distintivas sobre la base de que no se conoce formulación alguna en la rama farmacéutica, para el tratamiento y la mejoría de la calidad de la vida que se reivindica en la presente invención.

Descripción detallada de la Invención

La composición y las actividades farmacológicas de la presente invención del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* y/o sus derivados, le confieren un alto valor como medicamento de origen natural, así como actividad anti-inflamatoria, analgésica y anticancerígena que lo diferencia sustancialmente de otros productos similares en el mercado. Es completamente de origen natural donde se combinan componentes de elevada eficacia ante las células tumorales (péptidos), con otros que le confieren actividad analgésica y anti-inflamatoria. Adicionalmente, ejerce su acción beneficiosa a través de la inducción de apoptosis de células tumorales y a través de sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Estas características le confieren un alto valor para la mejoría de la calidad de vida en pacientes con enfermedades oncológicas y procesos inflamatorios asociados. Se ha encontrado que la composición del producto natural, objeto de la presente invención, está representada por un conjunto de proteínas de bajo peso molecular con actividad anti-cancerígena *in vitro*, cuya acción confirma una potencial actividad antitumoral *in vivo*.

Un objeto de la presente invención es la determinación de la composición y la descripción de los péptidos que constituyen los principios activos, presentes en el veneno, con actividad antitumoral. El resumen de la composición cualitativa, el tamizaje químico, las propiedades físico-químicas y la actividad farmacológica del veneno de escorpión se muestran en la Tabla I, II, III, IV, V, VI y VII respectivamente.

Tabla I. Tamizaje Químico del veneno completo de *Rhopalurus junceus*, que se emplea en las formulaciones de la presente invención.

Ensayo	Resultados
Ensayo de Dragendorff	negativo
Ensayo del Cloruro Férrico	negativo
Ensayo de Shinoda	negativo
Ensayo de Lieberman-Burchard	negativo
Ensayo de Ninhidrina	positivo
Carbohidratos	positivo
Lípidos	positivo

Tabla II. Determinación de iones metálicos presentes en el veneno completo de *Rhopalurus junceus*.

muestra	Na (mg/L)	Mg (mg/L)	K (mg/L)	Cu (mg/L)	Zn (mg/L)	Cd (mg/L)	Pb (mg/L)
Veneno de escorpión	114 ± 21	4.12 ± 0.28	4.66± 0.35	0.069±0.006	11.18±0.7	<0.004*	<0.01*

*metales pesados con niveles por debajo del límite inferior

5

Tabla III. Propiedades físico-químicas del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*., que se emplea en las formulaciones de la presente invención.

Propiedad	Índice de aceptación
pH	5-7
Contenido de proteínas	5-15 mg/mL
Apariencia	opalescente
Color	blanquecino

10

Tabla IV. Tabla de los pesos moleculares relativos de las proteínas (PMR), presentes en el veneno de escorpión, obtenidos mediante exclusión molecular empleando cromatografía líquida de baja presión y por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

15

Pesos moleculares relativos
≥72 kDa
60 kDa
45 kDa
30 kDa
14 kDa
8 kDa
≤4 kDa

Tabla V. Principios activos con actividad tóxica en células tumorales, identificados a partir del veneno completo de *Rhopalurus junceus*.

péptido	Peso molecular	Cantidad aminoácidos
RjLB-01	544.42 Da	10
RjLB-03	1964.0 Da	17
RjLB-04	4748.14 Da	43
RjLB-05	908.0 Da	8
RjLB-07	707.03 Da	7
RjLB-08	712.42 Da	17
RjLB-09	1203.44 Da	12
RjLB-14	5930.45 Da	50

5

Tabla VI. Resumen de los Estudios Toxicológicos

Toxicología General	Veneno de <i>R. junceus</i> (mg/kg)	Efecto
Toxicidad Aguda		
Vía Oral	2000	N. E.
Vía IP	5-20	DL ₅₀ =16,41mg/kg (M y H)
Irritabilidad		
Dérmica	-	N.E
Oftálmica	-	N.E
Mucosa Oral	-	N.E
Toxicidad a Dosis Repetida		
Toxicidad dosis repetida oral (28 días)	100	N.E
Toxicidad Subcrónica oral (90 días)	0,1-100	N. E.
Consumo de Agua y Alimentos	N. E.	
Ganancia de Peso	N. E.	
Parámetros Hematológicos y	N. E.	

Bioquímicos		N. E.	
Peso Relativo de órganos		N. E.	
Anatomía Patológica			
Toxicología Especial		Veneno de <i>R. junceus</i> (mg/kg)	Efecto
Micronúcleos en médula ósea de ratón	Oral(agudo)	2000	N.E
	Oral(dosis repetidas, 28 días)	100	N.E
	ip	4,10-13,13	N.E

Leyenda: N.E.-no efecto

Tabla VII. Resumen de los Estudios farmacológicos

5

Farmacología	Efecto
Antiproliferativo	Citotoxicidad en células tumorales epiteliales
Antitumoral	Retardo crecimiento tumores sólidos murinos
Antimetastásico	Disminución metástasis en pulmones en murinos
Analgésico	Disminución dolor SNC y periférico
Anti-inflamatorio	Disminución inflamación por vía tópica, oral, intraperitoneal

Para la determinación de la composición de la mezcla de la presente invención se llevaron a cabo los siguientes pasos:

10

- Determinación de proteínas totales por el método Lowry modificado.
- Tamizaje Químico
- Separación de los péptidos según grupos de pesos moleculares mediante Fraccionamiento por cromatografía líquida de baja presión mediante el uso de columna Superosa 12 HR 10/30.

- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- Separación del veneno completo y de los péptidos mediante Cromatografía líquida de alta resolución, empleando una columna C18 de fase reversa.
- 5 • Determinación de los espectros UV a longitudes de ondas 220nm y 280nm.
- Viabilidad celular en células normales y tumorales
- Análisis de cada uno de los péptidos de interés mediante espectrometría de masas.

10 El objeto de la presente invención es no tóxico, de acuerdo a los resultados mostrados en los ensayos de toxicidad aguda y subcrónica realizados en roedores.

Los estudios que se describen en detalle más adelante como ejemplos de realización del objeto de invención, no limitan en ninguna circunstancia el
15 alcance de la presente solicitud.

Para la realización de los experimentos recogidos en los ejemplos de realización se tomaron varios escorpiones a los cuales se les extrajo el veneno por estimulación eléctrica y se diluyó en agua destilada convenientemente. Posteriormente se clarificó por centrifugación a 10 000
20 rpm durante 15 min. para eliminación de constituyentes como mucus y debris celular. Al mismo se le realizó la determinación de proteínas a través del método de Lowry, mostrando una concentración entre 5-15 mg/mL.

Vía de administración intraperitoneal (ip)

Primeramente se administraron la sustancia de ensayo y el control positivo.
25 Pasados 30 min. se aplicaron entre 10-15µL de la solución de aceite de croton en cada una de las superficies (interna y externa de la oreja derecha del animal), la oreja izquierda se tomó como control. Transcurridas tres horas se sacrificaron los animales de acuerdo a las normas establecidas para la especie (según FELASA), se cortaron ambas orejas y ponches circulares
30 con un diámetro de 8mm fueron tomados con un sacabocado y pesados en balanza analítica.

Vía de administración tópica

Primeramente se aplicaron los 25-30 μ L de la solución de aceite de croton en cada una de las superficies (interna y externa de la oreja derecha del animal, la oreja izquierda se tomó como control). Inmediatamente después se aplicó la sustancia de ensayo. Transcurridas tres horas se sacrificaron los animales de acuerdo a las normas establecidas para la especie (según FELASA), se cortaron ambas orejas y ponches circulares con un diámetro de 8mm fueron tomados con un sacabocado y pesados en balanza analítica.

10 Vía de administración oral

Se aplicaron 25-30 μ L de la solución de aceite de croton en cada una de las superficies (interna y externa de la oreja derecha del animal, la oreja izquierda se tomó como control). Inmediatamente después se administró oralmente las muestras de ensayo. Transcurridas tres horas se sacrificaron los animales de acuerdo a las normas establecidas para la especie (según FELASA), se cortaron ambas orejas y ponches circulares con un diámetro de 8mm fueron tomados con un sacabocado y pesados en balanza analítica.

La aplicación tópica de aceite de croton ofrece un modelo de inflamación de la piel apropiada para la evaluación de agentes antiinflamatorios. El principio activo del aceite de croton es el Phorbol-12-Myristate 13-Acetate (PMA), potente agente proinflamatorio, cuya aplicación epicutánea resulta en cambios histológicos y bioquímicos que incluyen aumento de la permeabilidad vascular y ruptura vascular, infiltración leucocitaria, activación de proteína C y liberación incrementada de ácido araquidónico y sus metabolitos. Además se conoce que el PMA es un poderoso activador de neutrófilos y la oreja posee una extensa y rica irrigación sanguínea.

Vía de administración ip

La administración ip. de las dosis de 1-5 mg/kg de peso corporal inhibió la inflamación inducida por aceite de croton en la oreja del ratón (Tabla VIII), siendo la dosis de 3 mg/kg más efectiva que la administración de 15 mg/kg de dexametasona vía ip en los animales de experimentación al tener un mayor porcentaje de inhibición de la inflamación (97% vs 60,86%). La dosis de

5 mg/kg no difirió estadísticamente ($p>0,05$) del control positivo (dexametasona).

Tabla VIII. Efecto de la administración intraperitoneal del veneno de *R. junceus* en el modelo de edema auricular en ratón

Grupo		Extinción del edema (mg)	% Inhibición de la inflamación
Control		7,043 ± 0,27 a	-
Veneno de <i>R. junceus</i>	1 mg/kg	5,050 ± 1,47 b	27,12
	3 mg/kg	1,483 ± 0,93 c	97,46
	5 mg/kg	4,020 ± 1,41 db	44,09
Dexametasona 15 mg/kg		3,117 ± 1,09 d	60,86

5 Los valores son la media ± D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. ($p >0.05$)

Vía de administración Oral

10 Al administrar oralmente 5, 10 y 20 mg/kg de veneno de *R. junceus* se aprecia una disminución significativa en el peso de las orejas con respecto al grupo control negativo (Tabla IX), pero que no es estadísticamente comparable con la inhibición de la inflamación producida por la dexametasona, fármaco antiinflamatorio esteroidal por excelencia que inhibe la fosfolipasa A₂ (enzima responsable de la vía del ácido araquidónico).

15 Tabla IX. Efecto de la administración oral del veneno de *R. junceus* en al modelo de edema auricular en ratón

Grupo		Extinción del edema (mg)	% Inhibición de la inflamación
Control		11,28 ± 1,29 a	-
Veneno de <i>R. junceus</i>	5 mg/kg	7,68 ± 0,50 c	35,72
	10 mg/kg	8,05 ± 0,57 c	37,39
	20 mg/kg	7,76 ± 1,01 c	38,02
Dexametasona 15 mg/kg		4,87 ± 0,95 b	53,70

20 Los valores son la media ± D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. ($p>0,05$)

Vía de administración tópica

La administración tópica del veneno de *R. junceus* provocó una disminución del edema auricular respecto al grupo control, como puede apreciarse en la Tabla X.

5 Tabla X. Efecto de la administración tópica del veneno de *R. junceus* en al modelo de edema auricular en ratón

Grupo		Extinción del edema (mg)	% Inhibición de la inflamación
Control		12,00 ± 0,48 a	-
Veneno de <i>R. junceus</i>	10 mg/kg	8,87 ± 0,66 c	28,23
	20 mg/kg	8,25 ± 0,83 c	21,70
Bencidamina		4,87 ± 1,40 b	67,60

Los valores son la media ± D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. (p>0.05)

10 En la Tabla XI se pueden apreciar los resultados correspondientes al estudio realizado. La administración por vía oral del veneno de *R. junceus* provocó una discreta inhibición del tejido granulomatoso a formarse respecto al grupo control negativo, lo que sugiere actividad en la fase proliferativa de la inflamación. Ambas dosis del producto en estudio presentaron un

15 comportamiento similar.

Tabla XI. Efecto del veneno de *R. junceus* sobre los granulomas inducidos por pellets de algodón en ratas.

Grupo	Peso del granuloma (mg)	% inhibición
Control	103,33 ± 5,08 a	-
Dexametasona 3 mg/kg	55,40 ± 14,84 b	44,09
Veneno <i>R. junceus</i> 10 mg/kg	80,60 ± 4,74 c	20,95
Veneno <i>R. junceus</i> 20 mg/kg	83,10 ± 6,52 c	18,49

Los valores son la media $\pm$ D.S. Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente. ($p > 0.05$)

En la Tabla XII se muestran los valores del peso del granuloma y del contenido de carmín para los diferentes grupos experimentales. La toxina redujo el peso del granuloma 1,32 y 2,05 veces respecto al grupo control ($p < 0,05$) a las dosis de 3 y 5 mg/kg respectivamente.

La angiogénesis es un proceso esencial para el crecimiento del tumor y la metástasis por lo que contar con productos capaces de inhibir este complejo proceso constituye una alternativa para el tratamiento de enfermedades asociadas a tumores.

El contenido de carmín es un indicador de la formación de nuevos vasos sanguíneos en el granuloma aéreo. La administración de toxina redujo la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido granulomatoso en un 39,22 % y 69,24 % a las dosis de 3 y 5 mg/kg (ip) respectivamente con una diferencia estadística significativa entre todos los grupos experimentales ($p < 0,001$).

Tabla XII. Efecto del veneno de *R. juncus* por vía intraperitoneal sobre el peso del granuloma y el contenido de carmín en la Angiogénesis Inflamatoria inducida por adyuvantes en ratas (n=10).

Grupo		Peso granuloma (g $\pm$ D.S)	Contenido de carmín (A $\pm$ D.S)
Control		5,26 $\pm$ 1,11 ^a	0,413 $\pm$ 0,014 ^a
Veneno de <i>R. juncus</i>	3 mg/kg	3,59 $\pm$ 0,33 ^b	0,251 $\pm$ 0,015 ^b
	5 mg/kg	2,56 $\pm$ 0,74 ^b	0,127 $\pm$ 0,020 ^c

Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente ($p > 0,05$)

A: absorbancia a 490 nm

En la Tabla XIII se reportan los resultados del efecto analgésico del veneno de *R. juncus* al ser inoculado vía ip en el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético al 3%, en ratones.

Todos los grupos tratados con las diferentes dosis de veneno mostraron una marcada disminución ($p < 0,05$) en el número de constricciones abdominales

con respecto al grupo control negativo. Las dosis de 2,5 y 7,5 mg/kg de veneno produjeron un resultado similar al del grupo de la aspirina, reconocido agente analgésico. Por otra parte, la dosis de 5,0 mg/kg de veneno de *R. junceus* mostró un por ciento de inhibición superior (87,74%) al obtenido con la administración de 100 mg/kg de aspirina (49,28%).

Tabla XIII. Efecto de la administración intraperitoneal del veneno de *R. junceus* en el modelo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético.

Grupos experimentales	Dosis (mg/kg)	No. contorsiones $X \pm DS$	% inhibición del No. de contorsiones
CN	-	$36,22 \pm 5,11^a$	-----
ASA	150	$18,37 \pm 4,63^b$	49,28
Veneno de <i>R. junceus</i>	1	$22,25 \pm 4,53^b$	38,57
	2,5	$17,87 \pm 5,59^b$	50,66
	5	$4,44 \pm 4,33^c$	87,74
	7,5	$17,86 \pm 5,30^b$	50,69

CN: control negativo; No.: número

10 ASA: aspirina

Grupos con al menos una letra en común no difieren estadísticamente ($p > 0,05$)

Administración vía oral

15 Como se puede apreciar en la Tabla XIV, todos los grupos tratados con las diferentes dosis de veneno mostraron una marcada disminución ($p < 0,05$) en el número de constricciones abdominales con respecto al grupo control negativo.

Al comparar las dosis de veneno empleadas con el grupo control positivo (aspirina) se evidenció un marcado efecto analgésico. Las dosis de 10, 15 y 20 mg/kg de veneno de *R. junceus* produjeron una inhibición en las contracciones abdominales similares a la provocada por la aspirina; en tanto a pesar de que la dosis de 50 mg/kg no presentó diferencias estadísticas significativas con el control positivo, alcanzó un 54,78% de inhibición de las contorsiones abdominales en los animales de experimentación.

25 Tabla XIV. Inhibición de las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético tras la administración oral del veneno de *R. junceus*

Grupos experimentales	Dosis (mg/kg)	% inhibición del No. de contorsiones
CN	-	-----
ASA	150	47,01
Veneno de <i>R. juncus</i>	1	18,84
	5	32,84
	10	36,23
	15	39,85
	20	43,19
	50	54,78

CN: control negativo; No.: número

ASA: aspirina

- Modelo de analgesia térmica en ratones.

5 Se empleó la metodología descrita en Drug Discover.

Se utilizaron ratones OF1, machos, peso promedio 20-25 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Antes y después de la administración de la sustancia de ensayo los animales fueron puestos en un plato caliente (UGO-Basile) a temperatura constante de 55° C. Fue medida la latencia de la respuesta nociceptiva a través del lamido de las patas traseras o el salto. Solo los animales que mostraron respuesta nociceptiva antes de los 20 seg. Fueron tomados para el ensayo. El tiempo de corte fue de 40 seg.

10 Luego de administrar el control negativo (solución salina fisiológica), el control positivo (Codeína 4%) y las diferentes dosis del veneno de *R. juncus* se midió el tiempo de latencia de la respuesta para cada animal a las 2 y 3 horas.

15 En el presente trabajo se midió la reactividad nociceptiva al estímulo térmico en ratones utilizando el ensayo del plato caliente, el cual constituye una prueba de dolor agudo sensitivo para detectar analgesia opioide así como algunos tipos de reacciones hiperalgésicas de la espina dorsal. Se considera que una sustancia tiene propiedades analgésicas significativas cuando al ser administrada al animal, este duplica el tiempo normal de reacción.

20 El efecto analgésico del veneno de *R. juncus* se muestra en la Figura 1 y
25 Tabla XV. Los resultados indican que la administración ip de las tres dosis

del producto significativamente atenuó la estimulación térmica del plato caliente. En la Figura 1 se observa que las tres dosis de veneno de *R. junceus* incrementan significativamente los tiempos de latencia para mostrar respuesta nociceptiva en el ensayo de plato caliente en ratones.

5 La inhibición del dolor en los diferentes grupos experimentales se muestra en la Tabla XV. Se observa una potente acción inhibitoria de la algesia inducida por calor, produciéndose los mayores porcentos de inhibición a las 2 horas de administración. El efecto es potente a las 3 horas, y aunque las dosis de 2,5 y 7,5 mg/kg tienen un comportamiento similar al control positivo, es la
10 dosis mayor la que mantiene el efecto más prolongado en el tiempo y superior a la codeína.

Tabla XV. Efecto de la administración del veneno de *R. junceus* en el modelo del plato caliente.

15

Grupo	Dosis (mg/kg)	% de Inhibición	
		2 h	3h
Control	-	26,52 a	16,76 a
Veneno de <i>R. junceus</i>	2,5	173,96 b	92,53 b
	5,0	109,19 c	36,31 a
	7,5	145,55 bc	165,54 c
Codeína	40	120,35 c	94,17 b

20

25 Grupos con al menos una letra común, no difieren estadísticamente (p>0,05)

Los resultados del plato caliente evidencian que el veneno de *R. junceus* juega un papel antinociceptivo a niveles del sistema nervioso central superiores a la médula espinal puesto que la respuesta de lamido y salto
30 requiere de una mayor y más compleja integración neuronal.

Tabla XVI. Potencial pro-oxidante del veneno del escorpión *R. junceus* en el modelo de daño al ADN inducido por *Fenantrolina*/ Cu^{2+} .

Sustancia de prueba	Concentración (μ g/mL)	Magnitud del daño al ADN (DO a 532 nm; Media $\pm$ DE)
Control negativo	-	0,069 $\pm$ 0,004
veneno del escorpión <i>R. juncus</i>	7,50	0,023 $\pm$ 0,009*
	18,70	0,036 $\pm$ 0,002*
	37,50	0,047 $\pm$ 0,003*
	56,20	0,069 $\pm$ 0,012
	75,00	0,075 $\pm$ 0,011
Ácido ascórbico	200 μ M	0,130 $\pm$ 0,006*

Letras diferentes significan diferencia estadística ($p < 0,05$) respecto al control

5 Tabla XVII. Potencial pro-oxidante del veneno del escorpión *R. juncus* en el modelo de daño al ADN inducido por *Bleomicina/Fe³⁺*.

Sustancia de prueba	Concentración (μ g/mL)	Magnitud del daño al ADN (DO a 532 nm; Media $\pm$ DE)
Control negativo	-	0,040 $\pm$ 0,005
veneno del escorpión <i>R. juncus</i>	4,50	0,024 $\pm$ 0,006
	9,01	0,026 $\pm$ 0,010
	18,02	0,037 $\pm$ 0,008
	36,04	0,024 $\pm$ 0,001
	90,11	0,039 $\pm$ 0,001
Ácido ascórbico	200 μ M	0,647 $\pm$ 0,016*

Letras diferentes significan diferencia estadística ($p < 0,05$) respecto al control

10 Tabla XVIII. Células empleadas en los estudios de evaluación de la actividad biológica *in vitro* del veneno de escorpión *R. juncus*.

Líneas celulares	Forma de crecimiento	CC ₅₀ (mg/mL)
HeLa (carcinoma de cérvix humano)	monocapa	1
HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humano)	monocapa	0,78
NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano)	monocapa	0,69
A549 (carcinoma de pulmón humano)	monocapa	0,62
U937 (linfoma histiocítico humano)	suspensión	ND
L929 (fibrosarcoma murino)	monocapa	1,3
S-180 (sarcoma murino)	suspensión	ND
F3II (adenocarcinoma mamario murino)	monocapa	1,2
MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano)	Monocapa	2,2
Vero (células normales de riñón de mono verde africano)	Monocapa	ND
MDCK (células normales de riñón de perro)	monocapa	ND
N ₂ A (células de neuroblastoma murino)	monocapa	1,4
Macrófagos (extraídos del peritoneo en ratones Balb/c)	-	ND
Linfocitos (extraídos del bazo de ratones Balb/c)	suspensión	ND

ND: No determinado CC₅₀: concentración citotóxica media

5 Los cultivos celulares que crecen en monocapa (carcinomas) mostraron una inhibición significativa del crecimiento celular ($p < 0.05$) y mayor sensibilidad que las células normales y las células tumorales que crecen en suspensión.

La comparación de la CC₅₀ de la línea celular normal humana MRC-5 con las células tumorales humanas mostraron que el veneno del escorpión *R. junceus* presenta una diferencial y significativa citotoxicidad ($p < 0.05$) hacia
10 las células tumorales con respecto a las células normales (Tabla XVIII).

La exposición del veneno, provocó una inhibición significativa del crecimiento ($p < 0.05$), en las líneas celulares tumorales humanas y murinas que crecen en monocapa. Las líneas celulares tumorales U937 y S-180 (ambas crecen en suspensión) se mostraron menos sensible a la aplicación del veneno, la
15 afectación sólo se tradujo en una ligera disminución del crecimiento (Tabla XVIII).

Las celulares normales, los linfocitos y macrófagos peritoneales mostraron menor sensibilidad que las células tumorales. No se observaron efectos tóxicos significativos ($p>0.05$) en todo el espectro de concentraciones empleadas (Tabla XVIII).

- 5 La evaluación de la incidencia de las metástasis pulmonares al cabo de 50 días demostró, que la administración del veneno de escorpión provocó una reducción significativa (0,8 mg/kg; 3,2 mg/kg) en la aparición de metástasis espontáneas en los pulmones (Tabla XIX).

Tabla XIX. Incidencia de la aparición de metástasis pulmonares en ratones

- 10 Balb c implantados con el tumor mamario murino F3II. *diferencias estadísticamente significativa con respecto al control ($p<0,05$).

Grupo	Cantidad de ratones	Incidencia metástasis	# nódulos Metástasis (rango)
Control	6	4/6 66%	0-7
0,2 mg/kg	7	5/7 71%	0-7
0,8 mg/kg	5	2/5 42%	0-2*
3,2 mg/kg	5	2/5 42%	0-3*

Vía de administración oral

- 15 Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de adenocarcinoma mamario implantado en ratones Balb c. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al control se administró solución salina y todas las administraciones se realizaron por vía oral durante 35 días. El crecimiento tumoral se
- 20 monitoreó durante 35 días.

Los grupos experimentales tratados con el veneno del escorpión mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p<0.05$) cuando se compararon con el grupo control (Figura 4). Los grupos experimentales mostraron una relación dosis respuesta durante los 35 días de evaluación,

25 con respecto al retardo de la progresión tumoral.

Tabla XX. Tiempo de sobrevida promedio de los grupos experimentales implantados por vía intraperitoneal con 10⁶ células de S-180/ratón y tratados con el veneno del escorpión *R. juncus* por vía oral.

Dosis	control	6 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
Tiempo de Sobrevida (días)	20	20,5	24	22,5	20

Tabla XXI. Porciento de sobrevida de los grupos experimentales implantados por vía intraperitoneal con 10⁶ células de S-180 y tratados con el veneno del escorpión *R. juncus* por vía oral.

Dosis	Control	6 mg/kg	12,5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
sobrevida (%)	0	26	37	22	0

La dosis de 12,5 mg/kg mostró el mayor tiempo de vida media (24 días), seguido por la dosis de 25 mg/kg (22,5 días) y la dosis de 6 mg/kg (20,5 días) mientras los controles mostraron un tiempo de vida media de 20 días (Tabla XXI). De igual forma la dosis de 12,5 mg/kg evidenció los mayores porcentos de sobrevida cuando murió el 100% de los ratones en el grupo control (Tabla XXI), mientras que 6 mg/kg y 25 mg/kg mostraron 26% y 22% respectivamente. A pesar de estos resultados el incremento del tiempo de sobrevida y los porcentajes de sobrevida en los tres grupos experimentales (6 mg/kg, 12,5 mg/kg y 25 mg/kg) no fueron estadísticamente significativos. La dosis de 50 mg/kg mostró valores similares al control en todos los casos.

Ensayo de actividad antiproliferativa de las fracciones obtenidas en cromatografía de exclusión molecular

El efecto de las fracciones proteicas sobre el crecimiento celular se determinó de forma similar al ejemplo 6. En el estudio se emplearon 2 líneas celulares tumorales: HeLa, (carcinoma de cérvix humano) A549 (carcinoma

de pulmón humano) y la línea celular normal MRC-5, (fibroblastos de pulmón humano). Las fracciones quedaron a concentración final entre 9 µg/mL-600 µg/mL en los pocillos.

La evaluación de la citotoxicidad de las fracciones en las líneas celulares evidenció una inhibición del crecimiento en las células tumorales y escasa toxicidad en la célula normal para las fracciones LB-03 y LB-04. La tabla XXII muestra la CC_{50} para cada una de las fracciones provenientes de la purificación.

Tabla XXII. Pesos moleculares relativos y concentración citotóxica media de las fracciones obtenidas en cromatografía de exclusión molecular sobre líneas celulares tumorales y normales.

Fracciones del veneno de <i>R. juncus</i>	Pesos moleculares relativos*	Concentración citotóxica media (CC_{50}) (µg/mL)		
		Hela	A549	MRC-5
LB-01	30 kDa-72 kDa	835,3	420	245,1
LB-02	14 kDa-30 kDa	208,7	250	276,9
LB-03	4 kDa-8 kDa	140,1	116,6	439,2
LB-04	≤4 kDa	423,6	283	613,9

*pesos moleculares relativos determinados a partir de la curva de calibración log PM vs V_0/V_e . PM: pesos moleculares de las proteínas patrones. V_0 : Volumen muerto de la columna. V_e : volumen de elución de cada pico de proteína.

Las fracciones obtenidas en cromatografía de exclusión molecular en FPLC se corrieron en una electroforesis en geles de poliacrilamida con un gradiente entre un 4-20% para verificar la composición proteica de las mismas la cual se observa en la Fig. 7.

Las fracciones LB-03 y LB-04 presentan una composición de proteínas de bajo peso molecular y adicionalmente fueron las fracciones que mostraron mayor citotoxicidad sobre células tumorales (Hela y A549) y baja toxicidad sobre células normales (MRC-5).

Estas fracciones se sometieron a una repurificación mediante cromatografía líquida de alta resolución empleando una columna C18 analítica de fase reversa. Como fase móvil se emplearon dos soluciones: solución A (0,12% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua) y solución B (0,10% de TFA en

acetonitrilo). La elución de los componentes de las fracciones se realizó bajo un gradiente escalonado de 0 hasta 70% de la solución B en 70 minutos a un flujo de 0,5 ml/min y se detectaron a una longitud de onda de 220nm. Los péptidos puros obtenidos se evaluaron en células tumorales (Hela) y normales (CHO) de forma similar a como se describe en el ejemplo 6 y se determinaron el peso molecular y la secuencia proteica mediante espectrometría de masas acoplado a un equipo de cromatografía líquida de alta resolución.

Se obtuvieron ocho péptidos RjLB-01, RjLB-03, RjLB-04, RjLB-05, RjLB-07, RjLB-08, RjLB-09 y RjLB-14 con elevada actividad citotóxica sobre células tumorales y escasa toxicidad sobre las células normales. Estos resultados corroboran lo observado para el caso del veneno completo y confirma la toxicidad preferencial de los componentes del veneno sobre las células tumorales.

A partir de la purificación de los componente activos se determinaron las proporciones a las que se encuentran en el veneno (Tabla XXIII).

Tabla XXIII. Proporción de los principios activos dentro de la composición del veneno y rango de la actividad biológica in vitro sobre células tumorales.

Principio activo	proporción en el veneno (%)	Rango de actividad biológica in vitro (%)
RjLB-01	1,5-2,0	0,945 -1,89
RjLB-03	8-9	4,5 - 9
RjLB-04	0,5-1,0	0,445 - 0,89
RjLB-05	0,5-0,7	0,33-0,71
RjLB-07	0,5-0,8	0,5-1,0
RjLB-08	0,5-1,0	1,5-3,0
RjLB-09	0,3-0,6	3,65-4,1
RjLB-14	0,4-0,8	3,5-6,0

Para los péptidos RjLB-01, RjLB-03 y RjLB-04 se obtuvieron pesos moleculares de 908 Da, 1964 Da y 4748,14 Da respectivamente. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos de péptidos de venenos de escorpión y no se encontró homología con péptidos anteriormente descritos lo que evidencia adicionalmente la novedad de los resultados.

Otro objeto de la presente invención es la formulación obtenida de la siguiente forma. Se tomaron entre 50-100 escorpiones de la especie *Rhopalurus junceus* a los cuales se les extrajo el veneno por estimulación eléctrica y se diluyó en 10-20 mL de agua destilada. Posteriormente se clarificó por centrifugación a 10 000 rpm durante 15 min. Para eliminación de constituyentes como mucus y debris celular. Al mismo se le realizó la determinación de proteínas a través del método de Lowry, mostrando una concentración entre 5-15 mg/mL. A continuación el veneno de escorpión se diluye convenientemente empleando el agua destilada como único excipiente para obtener una formulación con un rango de concentración entre 0,05-0,1 mg/mL.

Breve descripción de las figuras.

En la Fig.1 se observa el comportamiento de la codeína (control positivo), fármaco analgésico central cuyo tiempo de vida media oscila entre las 2 y 3 horas, lo cual está en correspondencia con nuestros resultados.

La Fig. 2. muestra la electroforesis en geles de agarosa (1.5 %), del ADN extraído de las líneas celulares tumorales A549 y Hela. El veneno se aplicó a concentración final de 0.5 mg/mL por pocillo. El ADN de cada línea celular se extrajo a las 24h y 48h.

Carril M: Marcador de peso molecular Lambda DNA /Hind III;

Carril 1-3: Línea celular A549; 1: ADN control sin veneno, 2: ADN extraído a las 24h, 3: ADN extraído a las 48h.

Carril 4-6: Línea celular Hela; 4: ADN control sin veneno, 5: ADN extraído a las 24h, 6: ADN extraído a las 48h.

La figura Fig. 3. muestra la cinética de crecimiento tumoral en los grupos experimentales. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días. La inhibición del crecimiento tumoral fue dependiente de las dosis de veneno empleadas. Significación estadística con respecto al control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La Fig. 4. muestra la cinética de crecimiento tumoral en los grupos experimentales. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días. La inhibición del crecimiento tumoral fue dependiente de las dosis de veneno

empleadas. Significación estadística con respecto al control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La Fig.5 muestra el efecto de la administración oral del veneno de escorpión sobre la incidencia de las metástasis experimentales en pulmón.

5 Diferencia estadísticamente significativa ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La Fig. 6. muestra el perfil cromatográfico del veneno de escorpión *R. junceus* en cromatografía líquida de baja presión empleando una columna de exclusión molecular Superosa 12 HR10/30.

La Fig. 7. muestra la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, Se aplicaron las fracciones obtenidas en la purificación mediante cromatografía líquida de baja presión. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carril 2: Veneno Total; Carril 3: Fracción LB-01; Carril 4: Fracción LB-02; Carril 5: Fracción LB-03; Carril 6: Fracción LB-04.

La Fig.8. muestra la curva de concentración-respuesta de los péptidos puros obtenidos de la repurificación de las fracciones evaluadas. La evaluación se realizó sobre las células tumorales Hela (carcinoma de cérvix humano). Las concentraciones empleadas estuvieron de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ -400 $\mu\text{g/mL}$.

La Fig.9.muestra la curva de concentración-respuesta de los péptidos puros obtenidos de la repurificación de las fracciones evaluadas. La evaluación se realizó sobre las células no tumorales CHO (células de ovario de Hamster chino). Las concentraciones empleadas estuvieron de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ -800 $\mu\text{g/mL}$.

EJEMPLOS DE REALIZACION

Ejemplo 1 Modelo de inflamación aguda por inducción de edema auricular en ratón por aceite de croton.

Se utilizaron ratones OF1, machos, peso promedio 18-22 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se desarrolló la metodología descrita en el CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Lima. 30 Noviembre 1996). Se utilizó una solución de aceite de croton en acetona al 0,5%. La dexametasona se disolvió en CMC al 0,5%.

Ejemplo 2 Modelo de implantación de tacos de algodón en ratas.

Se utilizaron Ratas Sprague-Dawley con 180 g de peso corporal procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Se empleó el método de implantación de tacos de algón citado en el CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Lima. Noviembre 1996),

La inflamación es la respuesta del tejido frente a un daño. Esto involucra la participación y activación de enzimas, liberación de mediadores, extravación de fluido, migración celular así como ruptura y reparación de los tejidos (Vane 1995). Es bien conocido que el efecto antiinflamatorio puede estar dado por una variedad de agentes químicos y que existe una pequeña correlación entre su actividad farmacológica y estructura química (Sertie 1990) Esto, asociado con la complejidad del proceso inflamatorio hace necesario el uso de diferentes modelos experimentales para llevar a cabo un ensayo farmacológico. El modelo del granulosa por pellets de algodón en ratas es un ensayo utilizado frecuentemente para estudiar el efecto sobre inflamaciones crónicas. (Elieter 1999) Se ha demostrado que hay tres fases de inflamación después de la implantación del pellet, la última fase pertenece al proliferación celular que ocurre entre el tercer y sexto día, esta fase puede ser inhibida por antiinflamatorios esteroidales como la dexametasona y por fármacos antiinflamatorios no esteroidales (Sw 1972).

Transcurridos los 7 días de haberse implantado los pellets de algodón los animales fueron sacrificados por el método de eutanasia correspondiente y los pellets extraídos y procesados. La diferencia entre el peso final e inicial del pellet fue considerado como el tejido granulomatoso producido.

Ejemplo 3 Modelo de Angiogénesis inflamatoria

Se emplearon ratas Sprague Dawley machos, procedentes del CENPALAB con un peso corporal entre 180-240 g.

La angiogénesis inflamatoria es un proceso complejo que involucra una serie de mecanismos moleculares diferentes en muchos aspectos pero básicamente semejantes en que se desarrollan mediante una cascada angiogénica.

Después de un período de 6 días de haber sido inducida la formación del granuloma, este se observó bien definido y palpable en el grupo control, lo cual se corresponde con los resultados reportados por Primelles en 2001. En el caso de los animales tratados con las dosis de veneno, los granulomas

eran de menor tamaño al tacto y al observarlos macroscópicamente tenían los bordes con menor definición y estaban menos adheridos a la epidermis.

Ejemplo 4. Actividad analgésica

- Modelo de inducción de contorsiones por ácido acético en ratones,

5 Se procedió según la metodología descrita en CYTED.
Se utilizaron ratones OF1, machos, peso promedio 20-25 g procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Administración vía intraperitoneal

10 Las dosis de 1; 2,5; 5 y 7,5 mg/kg de veneno de *R. junceus* fueron inoculados por vía intraperitoneal. Treinta minutos después se les administró a los animales de experimentación, vía ip, 0,1 mL de una solución de ácido acético al 3% y se registraron el número de contorsiones/animal durante 10 minutos a partir de la primera contorsión observada.

15

Administración vía oral

Las dosis de 1, 5, 10, 15, 20 y 50 mg/kg de veneno de *R. junceus* administrados por vía oral. Una hora después se les administró a los animales de experimentación, vía ip, 0,1 mL de una solución de ácido acético
20 al 3% y se registraron el número de contorsiones/animal durante 10 minutos a partir de la primera contorsión observada.

Ejemplo 5. Evaluación de la actividad antioxidante

Se evaluó la actividad anti-oxidante *in vitro* del veneno de *Rhopalurus junceus*, a través del efecto protector del ADN frente a procesos oxidativos
25 en los sistemas Cobre-Fenantrolina y Bleomicina-Hierro. El veneno demostró tener actividad antioxidante al proteger al ADN de los procesos de peroxidación.

En los sistemas Cobre-Fenantrolina y Bleomicina-Hierro se observó que el derivado de *Rhopalurus junceus* presente en las formulaciones descritas con
30 anterioridad no ejerce efecto pro-oxidante sobre el ADN. Los valores de absorbancia obtenidos con las diferentes concentraciones del derivado de *Rhopalurus junceus*, son inferiores a los obtenidos con el control positivo. Los resultados de dicha evaluación se muestran en las Tablas XVI y XVII.

Ejemplo 6. Citotoxicidad in vitro en un panel de células tumorales y normales

III El efecto del veneno sobre el crecimiento celular, se detectó por el ensayo del MTT, el cual mide la proliferación celular debido a la reducción metabólica de esta sal de tetrasolio (amarillo), por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. El compuesto resultante (azul de formazán) puede ser solubilizado y cuantificado espectrofotométricamente.

En el estudio se emplearon 9 líneas celulares tumorales: HeLa (carcinoma de cérvix humano), HEP-2 (carcinoma epidermoide de laringe humano), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), U937 (linfoma histiocítico humano), L929 (fibrosarcoma murino), S-180 (sarcoma murino) y F3II (adenocarcinoma mamario murino). De igual forma se emplearon 3 líneas celulares normales: MRC-5, (fibroblastos de pulmón humano), Vero (células normales de riñón de mono verde africano) y MDCK (células normales de riñón de perro). Se evaluaron además: Macrófagos peritoneales (extraídos del peritoneo de ratones Balb/c) y Linfocitos (extraídos del bazo de ratones Balb/c). Las células fueron crecidas en frascos de cultivo en medio mínimo esencial (MEM) ó medio RPMI-1640, según las características del cultivo celular, suplementados con 2 mM de glutamina, aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina-estreptomicina 100UI/mL – 100 µg/mL. Cada una se incubó en atmósfera húmeda a 37°C a 5% de CO₂ hasta formación de monocapa. Cada línea celular se desprendió por tratamiento con una solución de tripsina-EDTA 0,25 % y se prepararon a concentración de 2 x 10⁵ células/mL, después de ser contadas en cámara de Neubauer.

El ensayo se realizó en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos, para cultivos celulares (*Corning Inc. Costar[®]*). En cada pocillo se adicionó 50 µL de cada línea celular y se incubaron en atmósfera de 5% CO₂ a 37°C durante 24h. Al cabo de este tiempo se adicionaron 50 µL de medio con el veneno previamente disuelto. El veneno quedó a concentración final de 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL y 1 mg/mL en los pocillos. Todas las líneas celulares quedaron a concentración final de 10⁴ células/pozo. El suero fetal bovino (SFB) se empleó en el medio al 10%.

Las placas se incubaron nuevamente en atmósfera de 5% CO₂ a 37°C durante 3 días. Al cabo de este tiempo se adicionaron 10 µL de una solución

estéril de MTT (sales de tetrazolio 5 mg/mL en PBS estéril) en cada pocillo y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 4h. Finalmente el medio se decantó y se adicionó 200 μ L/pozo de solución de dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubaron a 37°C durante 30 min. en atmósfera húmeda. La densidad óptica (DO) se leyó en un lector de microplacas de *ELISA MRX Revelation Dynex Technologies* a 560 nm con 630 nm como referencia. Cada concentración de las fracciones se realizó por triplicado y se realizó 4 veces el ensayo.

Para análisis de las curvas de concentración-respuesta se graficó el porcentaje de proliferación celular, calculada la fórmula $(1-DO \text{ (muestra)}/DO \text{ (control)}) \times 100$ contra las diferentes concentraciones de veneno. La concentración citotóxica media se expresó como la CC_{50} , la concentración del veneno que causa el decrecimiento del 50% en el número de células viables (absorbancia del MTT) comparada con controles no tratados y aparece expresada en la tabla XV para cada una de las células evaluadas.

Ejemplo 7. Estudio de apoptosis

Se realizó el estudio de determinación de apoptosis mediante fragmentación de ADN. Se emplearon las líneas celulares Hela y A549. Los resultados se observan en la Figura 2. La fragmentación del ADN, característico de la apoptosis, se observó en los carriles correspondientes a las células Hela tratadas con el veneno, mientras que en los pocillos controles y en la línea celular A549 se observó una única banda correspondiente al ADN cromosomal intacto. Estos resultados evidencian que el veneno de escorpión puede inducir la muerte celular por ambos mecanismos apoptosis y necrosis.

Ejemplo 8. Actividad antitumoral tumores sólidos. Modelo Experimental de adenocarcinoma mamario F3II. Vía de administración intraperitoneal.

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de adenocarcinoma de mamas implantado en ratones Balb c. Se emplearon 3 dosis para los grupos de tratamiento (0,2 mg/kg, 0,8 mg/kg, y 3,2 mg/kg), al control se administró solución salina todos por vía intraperitoneal. El crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días. Al cabo de 50 días a partir de la implantación del tumor se sacrificaron los animales, se les extrajo los pulmones y se analizó la aparición de metástasis pulmonares.

Los grupos experimentales tratados con el veneno del escorpión mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p < 0.05$) cuando se

compararon con el grupo control (Figura. 3). Los grupos experimentales mostraron una relación dosis respuesta durante los 35 días de evaluación, con respecto al retardo de la progresión tumoral. La disminución significativa de la progresión tumoral encontrada en los grupos tratados, indica que el
5 veneno del escorpión *R. junceus* tiene efecto antitumoral al afectar el crecimiento del tumor al menos durante el período de evaluación.

Ejemplo 9

Modelo Experimental de adenocarcinoma mamario F3II.

10 Vía de administración oral.

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de adenocarcinoma de mamas implantado en ratones Balb c. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al control se administró solución salina todos por vía oral. El
15 crecimiento tumoral se monitoreó durante 35 días.

Los grupos experimentales tratados con el veneno del escorpión (12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg) mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p < 0.05$) cuando se compararon con el grupo control (Figura. 4). La disminución significativa de la progresión tumoral encontrada en los grupos
20 tratados, indica que el veneno del escorpión *R. junceus* tiene efecto antitumoral al afectar el crecimiento del tumor al menos durante el período de evaluación.

Ejemplo 10

25 Actividad antimetastásica. Modelo Experimental de metástasis pulmonares

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión sobre las metástasis pulmonares en un modelo de adenocarcinoma mamario implantado en ratones Balb/c. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al control se administró solución
30 salina. Al cabo de 24 h de implantación del tumor en los pulmones por vía intravenosa, se comenzaron los tratamientos los que se realizaron diariamente en el horario de la mañana durante 21 días. Al cabo de 24 horas después de la última administración todos los grupos experimentales fueron sacrificados por dislocación cervical, los pulmones fueron extraídos para
35 análisis de la ocurrencia de metástasis.

En todos los casos la incidencia del tumor fue del 100%. El grupo experimental administrado con 6 mg/kg mostró niveles superiores al control con relación a la ocurrencia de metástasis. Los grupos experimentales tratados con la dosis de 25 mg/kg evidenciaron una disminución de la ocurrencia de metástasis comparados con el control sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El grupo experimental tratado con las dosis de 12,5 mg/kg y 50 mg/kg mostraron una reducción estadísticamente significativa de la ocurrencia de metástasis cuando se comparó con el control (Figura 5).

Ejemplo 11

Actividad antitumoral tumores ascíticos. Modelo Experimental de Sarcoma (S-180)

Se evaluó el efecto del veneno del escorpión en un modelo de Sarcoma murino implantado en el peritoneo en ratones NMRI. Se emplearon 4 dosis para los grupos de tratamiento (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg), al grupo control se administró solución salina. El veneno se administró 24h después de implantado el tumor diariamente hasta la mortalidad del 100% de todos los grupos experimentales. La tabla XX muestra los resultados del tiempo de sobrevida de los animales tratados y los controles. La tabla XXI muestra los porcentos de sobrevida de los grupos experimentales.

Ejemplo 12

Purificación e identificación de proteínas del veneno como principios activos.

Para realizar el fraccionamiento del contenido proteico total, el veneno total se disolvió en acetato de amonio 0.1 M (NH_4Ac) y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se aplicó en un equipo de cromatografía líquida de baja presión AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) implementado con una columna de gel filtración Superosa12 HR 10/30, con dimensiones 10 x 300 mm. La columna se equilibró con 0.1 M de NH_4Ac y el material eluyó en el mismo solvente a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La absorbancia se monitoreó a una densidad óptica (DO) de 280 nm durante 72 min. La columna de exclusión molecular Superosa 75 HR 10/30 se calibró mediante un Kit de proteínas patrones: ribonucleasa A

(13,7Kda), quimotripsinógeno (25Kda), ovoalbúmina (43Kda), albúmina (67Kda) y azul dextrana 2000. Se realizó una curva patrón para determinar los pesos moleculares relativos de las diferentes fracciones de proteínas obtenidas durante la cromatografía. Los resultados de las corridas
5 cromatográficas se observan en la Fig.6.

Ejemplo 13

Estudios clínicos de la formulación en pacientes humanos con cáncer.

- 10 El objetivo del estudio fue la evaluación de la calidad de vida en pacientes oncológicos. Para la inclusión de los sujetos de estudio se utilizaron pacientes de ambos sexos con confirmación histológica de cáncer en cualquier estadio. Se elaboró un documento que contenía el acta el consentimiento informado del paciente y el resumen de historia clínica
15 expedido por el oncólogo de base. En el documento se incluyó la evaluación del comportamiento clínico de los pacientes la cual se siguió a través de la evolución clínica realizada por los facultativos en su hospital de base. La periodicidad del seguimiento fue de al menos dos meses. El seguimiento se realizó durante 1 año. Se preparó la formulación en frascos con volúmenes
20 de 40 mL con concentraciones entre 0,05-0,1 mg/mL. El frasco se diluyó en agua destilada empleada como excipiente hasta completar 1 litro. La administración del producto se realizó diariamente por vía oral y las dosis recomendadas fueron dependientes del estadio del paciente y el diagnóstico histológico.
- 25 Se incluyeron un total de 100 pacientes en el estudio y las principales localizaciones evaluadas fueron cáncer de mama, próstata, colon, pulmón, cerebro y páncreas. La administración del producto en ninguno de los casos provocó reacciones adversas durante el tratamiento, correspondiéndose con lo observado en los estudios preclínicos. En todos los casos se observó
30 aumento de la calidad de vida que incluyó mejoría de las variables clínicas fundamentales como fueron disminución o desaparición de la disnea y tos en la totalidad de los casos de los pacientes con cáncer de pulmón. Se constató en muchos pacientes mejoría radiológica por la estabilización de las lesiones, en algunos casos y desaparición de estas, en otros. Adicionalmente se logró
35 la estabilización de las variables hematológicas y disminución del dolor y la

inflamación. En mas del 50% de los pacientes tratados durante 1 año, con la formulación objeto del la invención, se superó el tiempo de sobrevida estimado para algunas de las patologías estudiadas.

Ejemplo 14.

5 Estudios clínicos del VIDATOX[®] 30 CH.

El VIDATOX[®] 30 CH es un bioterápico homeopático, desarrollado en el laboratorio de homeopatía de LABIOFAM, que tiene como principio activo el veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* en dilución 30 centesimal. Su presentación es en forma de gotas en vehículo alcohólico al 33 %.

- 10 En estudios realizados en 174 pacientes de ambos sexos con tratamientos oncoespecíficos se demostró el efecto adyuvante del VIDATOX[®] 30 CH en el tratamiento del cáncer en diferentes localizaciones (pulmón, próstata, mama, colon, páncreas, t. linfoide, cerebro, recto, etc.). Sus resultados señalan que el 96% de los pacientes administrados tuvieron una sobrevida mayor de 12
- 15 meses, que el 90% reportaron mejorías de los síntomas clínicos motivos de consulta y que el dolor en 63 de estos pacientes (como síntoma predominante) en el 62% de los casos evolucionó hacia una forma moderada que no requería necesariamente tratamiento para su alivio, que el 27% manifestaron ausencia de dolor y que en ninguno de los casos reportó
- 20 reacciones adversas relacionadas con el tratamiento.

REIVINDICACIONES

- 1) Péptido nombrado RjLB-01, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 544.42 Da de peso molecular y
5 secuencia aminoacídica SEQ. ID No.1
- 2) Péptido nombrado RjLB-03, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 1964.0 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID No.2
- 3) Péptido nombrado RjLB-04, proveniente del veneno de
10 escorpión, caracterizado por poseer 4748.14 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ.ID No.3
- 4) Péptido nombrado RjLB- 05, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 908.0 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No.4
- 15 5) Péptido nombrado RjLB-07, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 707.03 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No. 5.
- 6) Péptido nombrado RjLB-08, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 712.42 da de peso molecular y
20 secuencia aminoacídica SEQ ID No.6.
- 7) Péptido nombrado RjLB-09, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 1203.44 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID. No. 7.
- 8) Péptido nombrado RjLB-14, proveniente del veneno de
25 escorpión, caracterizado por poseer 5930.45 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID. No 8
- 9) Composiciones farmacéuticas, que son obtenidas, a partir del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus*, caracterizadas por poseer péptidos como principios activos con elevada actividad citotóxica sobre
30 células tumorales, mezcladas con agua destilada como excipiente.
- 10) Composiciones farmacéuticas según reivindicación 9, procesadas homeopáticamente.

11) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 9 que contienen al menos un péptido según las reivindicaciones de la 1 a la 8, que presenta actividad antitumoral, dicho péptido seleccionado, presenta cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas.

5 12) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 11 caracterizada por poseer una mezcla de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Rophalurus junceus* en las concentraciones siguientes: RJLB-01 en un rango del 1,5-2,0%; RJLB-03 en un rango del 8-9 %; RJLB-04 en un rango del 0,5-1,0 %; RJLB-05 en un rango 0,5-0,7%; RJLB-07 en un rango
10 de 0,5-0,8 %; RJLB-08 en un rango del 0,5-1,0%; RJLB-09 en un rango del 0,3-0,6 %; RJLB-14 en un rango del 0,4- 0-8 % diluidos en 10-20 ml de agua destilada.

13) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 12 procesados homeopáticamente.

15 14) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 9, 10, 11, 12 y 13 empleadas en formulaciones para administración por vía oral, tópica, parenteral, rectal, vaginal y aerosol.

20

25

30

35

**PÉPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPIÓN *RHOPALURUS JUNCEUS* Y
COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA.**

RESUMEN

5

La presente invención se relaciona con nuevos péptidos obtenidos a partir del veneno de escorpión *Rhopalurus junceus* el que se caracteriza por un alto contenido en proteínas, lípidos, carbohidratos, aminoácidos, sales inorgánicas y otros iones incluidos péptidos como principios activos. La
10 invención también incluye una formulación empleada como medicamento por sus propiedades como anticancerígeno, analgésico y antiinflamatorio que conducen a la elevación de los índices de la mejoría de la calidad de vida en pacientes con enfermedades oncológicas.

15

20

Sequence listing
LISTA DE SECUENCIAS

<110> Grupo Empresarial Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas

<120> Péptidos del veneno de escorpión Rhopalurus junceus y composición farmacéutica.

<130> 01-00001

<140> PCT/CU2011/000006

<141> 2011-09-27

<150> CU2010-0186

<151> 2010-09-27

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 1

Arg Thr Gly Ser Leu Leu Thr Leu Ala Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 2

Asp Leu Phe Asp Glu Leu Asp Pro Gln Lys Asp Glu Leu Asp Gln Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 3

<211> 43

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 3

Phe Glu Leu Lys Asp Leu Glu Gly Gln Thr Leu Tyr Leu Lys Asp Leu
1 5 10 15

Glu Gly Lys Thr Cys Ser Gly Gly Glu Leu Asp Lys Glu Glu His Cys
20 25 30

Gly Gly Asn Glu Leu Asp Ser Gln Gly Phe Asn
35 40

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

Sequence listing

<400> 4

Met Leu Leu Asp Asn Val Gly Phe
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 5

Asp Met Gly Ala Leu Leu Ser
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 6

Phe Asp Glu Thr Ala Lys Asp Glu Leu Leu Gly Phe Leu Gly Leu Phe
1 5 10 15

Asn

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 7

Leu Pro Cys Ala Leu Asn Asp Gly Gly Leu Cys Lys
1 5 10

<210> 8

<211> 50

<212> PRT

<213> Rhopalurus junceus

<400> 8

Val Met Gln Asp Gln Tyr Leu Ile Ile Asn Gly Val Trp Ser Ile Val
1 5 10 15

Phe Phe Leu Glu Val Ser Ile Leu Val Ile His Ile Phe Leu Leu Arg
20 25 30

Glu His Glu Val Phe Val Val Arg Arg Gly Asp Glu Thr Ala Lys Asp
35 40 45

Glu Leu
50

1/6

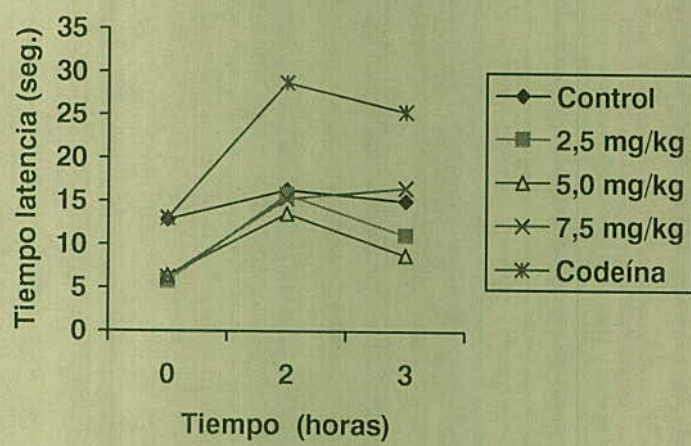


Fig.1

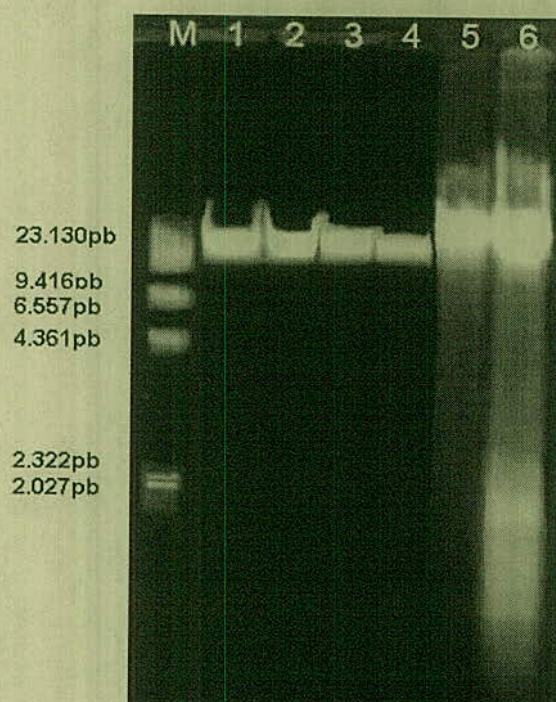


Fig. 2

2/6

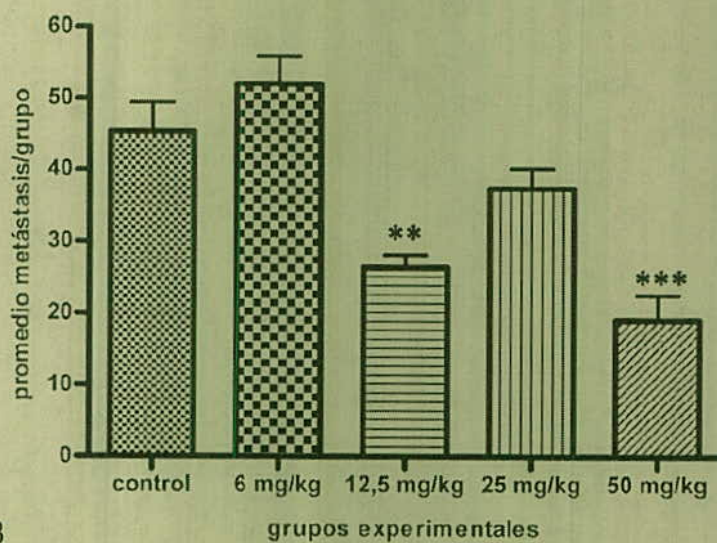


Fig.3

Fig.5

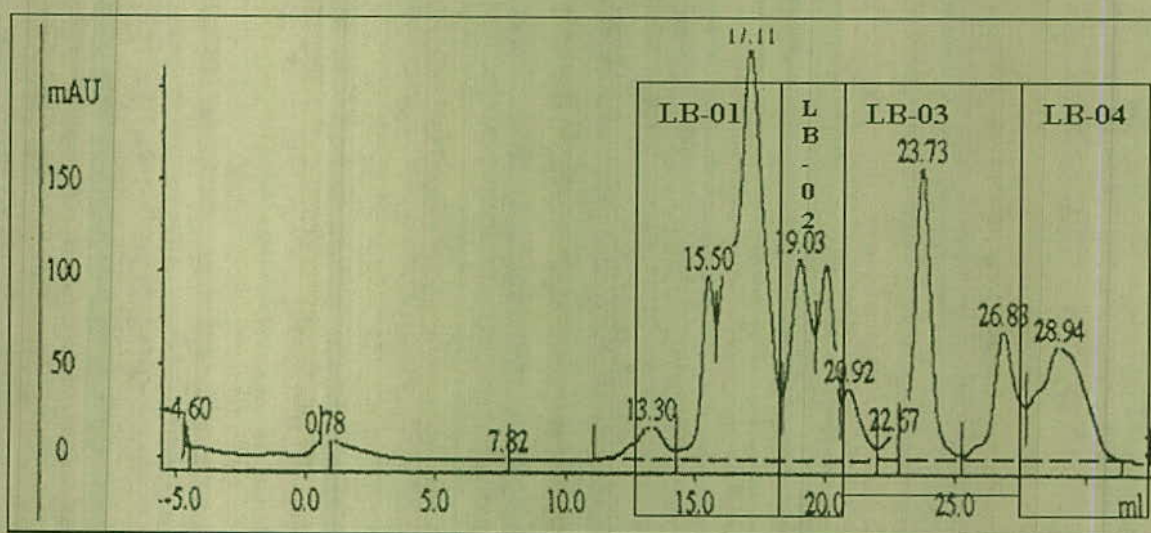


Fig. 6

3/6

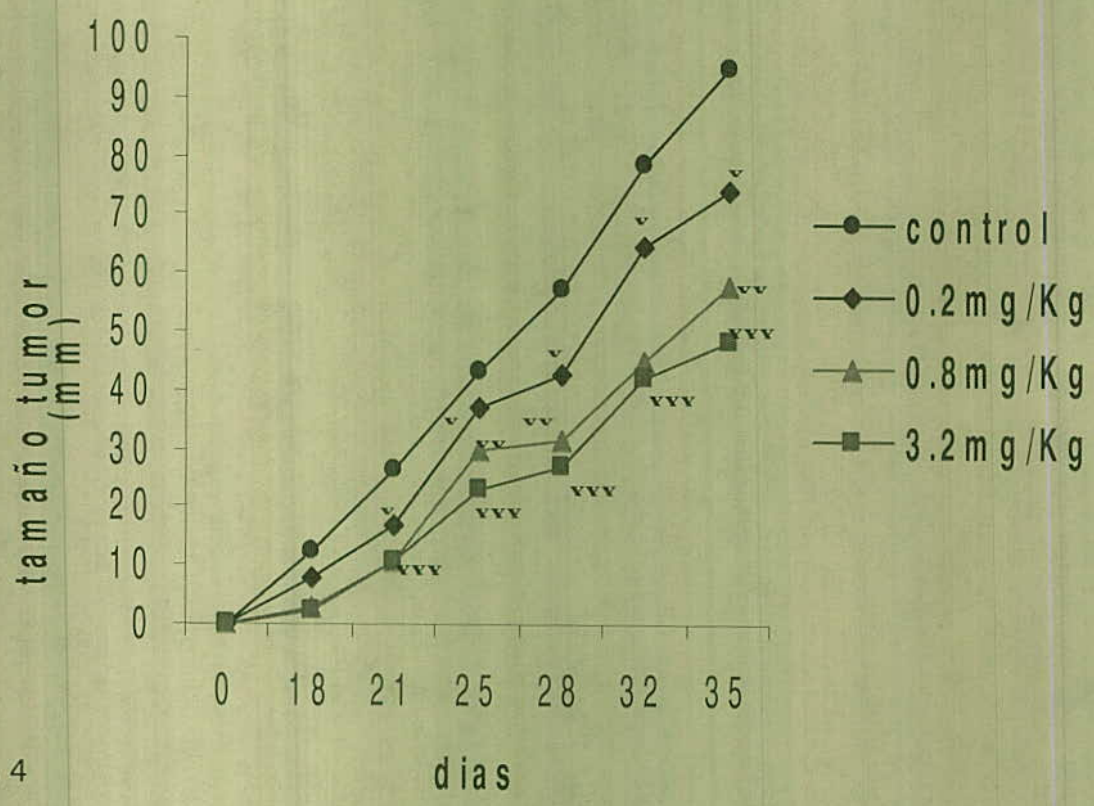
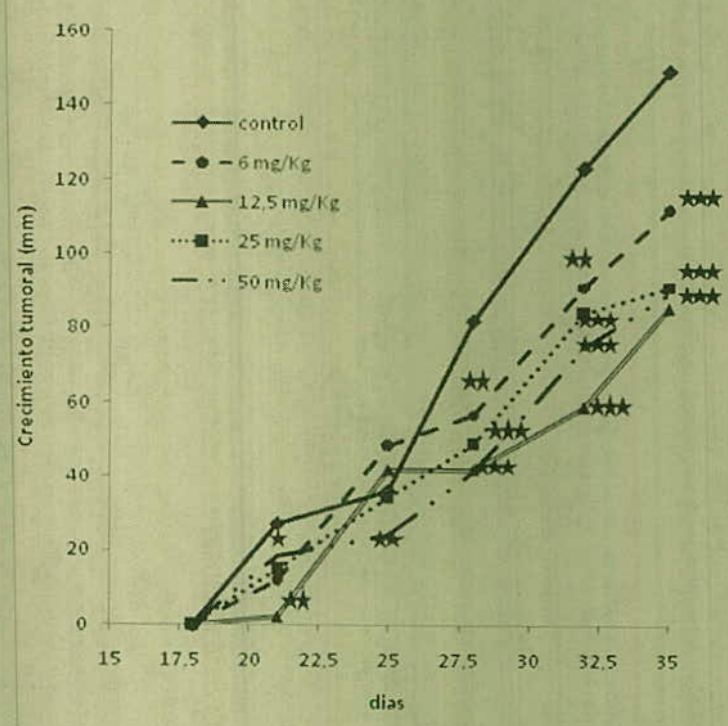


Fig. 4



4/6

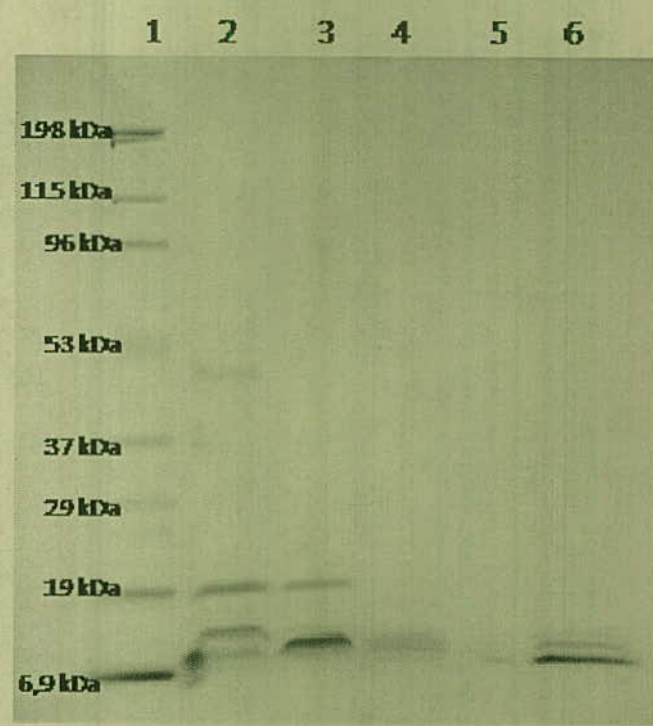


Fig. 4

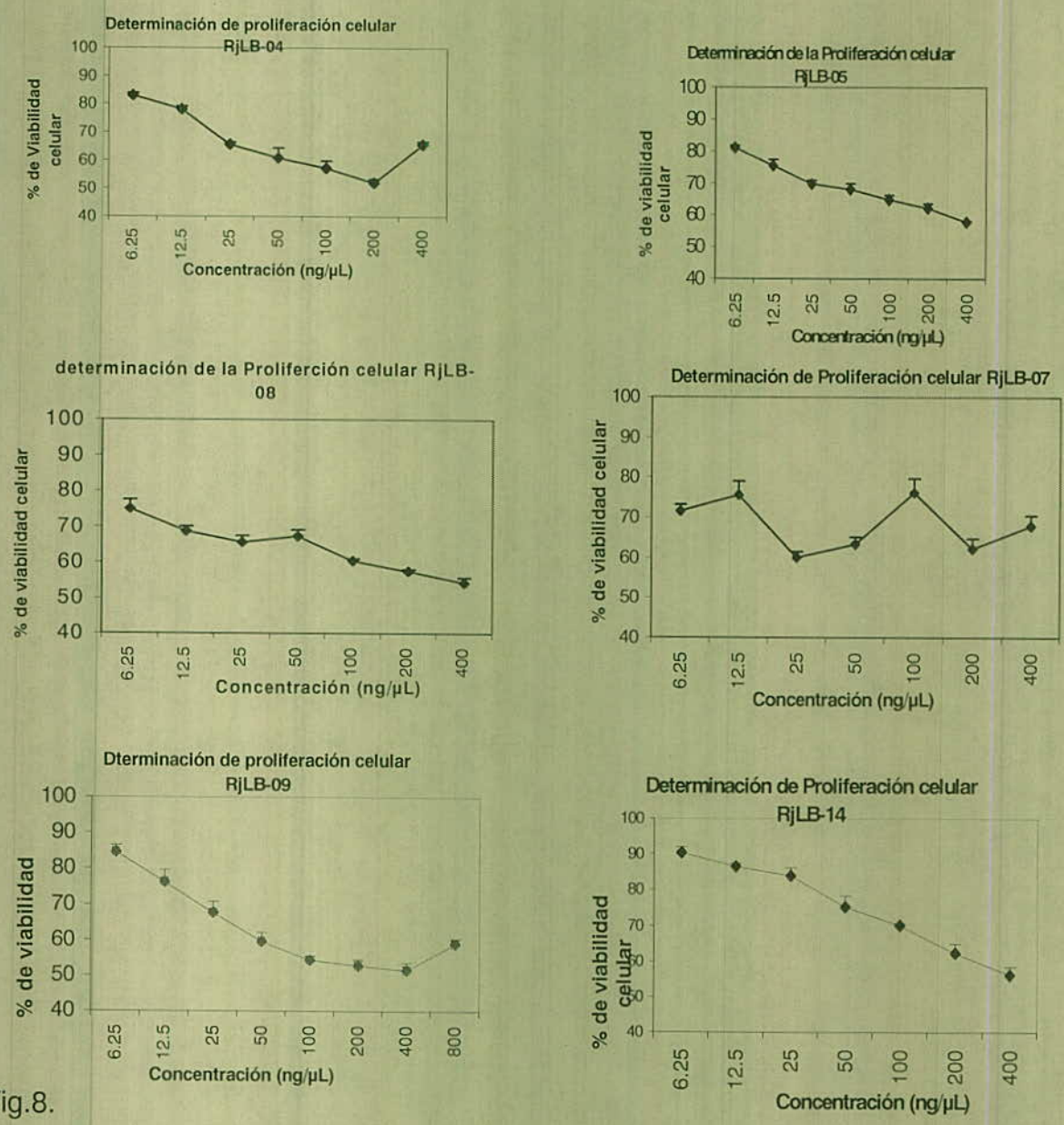
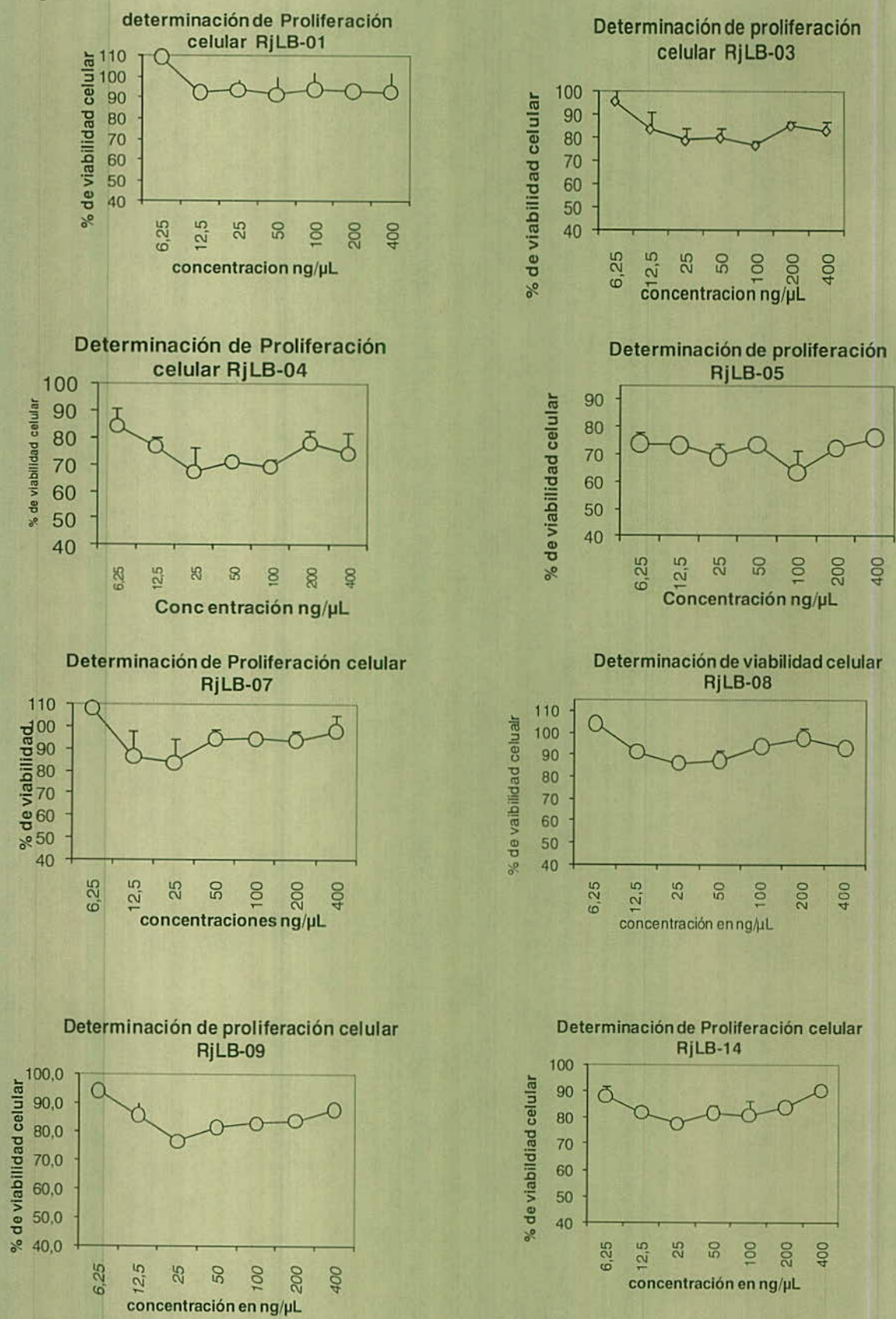


Fig.8.

Fig.9.



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS					
PATENTE DE INVENCION _____		PCT <u>X</u>		MODELO DE UTILIDAD _____		DISEÑO INDUSTRIAL _____	
(21)	No. de solicitud			(22)	Fecha de solicitud		
(51)	Clasificación internacional C07K 14/435						
(71)	Solicitante (s) GRUPO EMPRESARIAL DE PRODUCCIONES BIOFARMACEUTICAS Y QUIMICAS						
(72)	Inventor (es) FRAGA CASTRO, José, Antonio; MEDINA GALI, Regla, María; DIAZ GARCIA, Alexis; GUEVARA ORELLANES, Irania; RODRIGUEZ TORRES, Caridad, Clara; RODRIGUEZ COIPEL, Judith; RIQUENES GARLOBO, Yanelis; GONZALEZ MARRERO, Isbel; PEREZ CAPOTE, María, Regla						
(74)	Apoderado DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO						
(30)	Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
			2010-0186		2010-09-27		CU
(85)	Fecha inicio fase nacional:					(87)	Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT					Fecha: 05/04/2012	
	Fecha de presentación de la solicitud: 27/09/2011					Nº publicación: WO/2012/041261 A2	
	No. de solicitud: PCT/CU2011/000006						
(54)	Título: PÉPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPIÓN RHOPALORUS JUNCUS Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA						

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN	
	☐ Patente de Invención	☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl: C07K 14/435
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) GRUPO EMPRESARIAL DE PRODUCCIONES BIOFARMACEUTICAS Y QUIMICAS
(30) Prioridad	(72) Interventor (es) FRAGA CASTRO, José, Antonio MEDINA GALLI, Regla, María DIAZ GARCIA, Alexis GUEVARA ORELLANES, Irania RODRIGUEZ TORRES, Caridad, Clara RODRIGUEZ COIPEL, Judith RIQUENES GARLOBO, Yanelis GONZALEZ MARRERO, Isbel PEREZ CAPOTE, María, Regla
(31) No. Prioridad 2010-0186	
(32) Fecha 27/09/2010	
(33) Pais CU	(74) Apoderado (s) DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
(54) Título PÉPTIDOS DEL VENENO DE ESCORPIÓN RHOPALORUS JUNCEUS Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 27/09/2011 No. de solicitud PCT/CU2011/000006	(87) Publicación internacional Fecha 05/04/2012 No. Publicación WO/2012/041261 A2

Resumen reivindicación (es):

- 1) Péptido nombrado RjLB-01, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 544.42 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID No.1
- 2) Péptido nombrado RjLB-03, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 1964.0 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID No.2
- 3) Péptido nombrado RjLB-04, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 4748.14 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ.ID No.3
- 4) Péptido nombrado RjLB- 05, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 908.0 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No.4
- 5) Péptido nombrado RjLB-07, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 707.03 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No. 5.
- 6) Péptido nombrado RjLB-08, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 712.42 da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ ID No.6.
- 7) Péptido nombrado RjLB-09, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 1203.44 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID. No. 7.
- 8) Péptido nombrado RjLB-14, proveniente del veneno de escorpión, caracterizado por poseer 5930.45 Da de peso molecular y secuencia aminoacídica SEQ. ID. No 8
- 9) Composiciones farmacéuticas, que son obtenidas, a partir del veneno del escorpión Rhopalurus junceus, caracterizadas por poseer péptidos como principios activos con elevada actividad citotóxica sobre células tumorales, mezcladas con agua destilada como excipiente.
- 10) Composiciones farmacéuticas según reivindicación 9, procesadas homeopáticamente.
- 11) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 9 que contienen al menos un péptido según las reivindicaciones de la 1 a la 8, que presenta actividad antitumoral, dicho péptido seleccionado, presenta cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas.
- 12) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 11 caracterizada por poseer una mezcla de péptidos presentes en el veneno del escorpión Rophalurus junceus en las concentraciones siguientes: RjLB-01 en un rango del 1,5-2,0%; RjLB-03 en un rango del 8-9 %; RjLB-04 en un rango del 0,5-1,0 %; RjLB-05 en un rango 0,5-0,7%; RjLB-07 en un rango de 0,5-0,8 %; RjLB-08 en un rango del 0,5-1,0%; RjLB-09 en un rango del 0,3-0,6 %; RjLB-14 en un rango del 0,4- 0-8 % diluidos en 10-20 ml de agua destilada.
- 13) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 12 procesados homeopáticamente.
- 14) Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación 9, 10, 11, 12 y 13 empleadas en formulaciones para administración por vía oral, tópica, parenteral, rectal, vaginal y aerosol.



No. 13-105491- -00000-0000

Fecha: 2013-04-25 14:48:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

PATENTE DE INVENCION _____ MODELO DE UTILIDAD _____ Art 33 Decisión 486/00

Indicación que se solicita una patente.
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Descripción de la invención
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa _____ Incompleta _____

PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD PCT _____ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

X Indicación que se solicita una PCT
X Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
X Dibujos de ser estos pertinentes
X Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa X Incompleta _____

DISEÑO INDUSTRIAL _____ (Art. 119 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita Diseño industrial
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____

ESQUEMA DE TRAZADO _____ (Art. 92 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita un esquema de trazado
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica de un esquema de trazado
Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____