

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 815**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2008 PCT/EP2008/059260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2009 WO09016031**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2008 E 08775109 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2185203**

54 Título: **Avidina oxidada con alto tiempo de residencia en los tejidos tratados**

30 Prioridad:

**02.08.2007 EP 07113733**  
**03.06.2008 EP 08157473**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.07.2017**

73 Titular/es:

**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE**  
**RIUNITE S.P.A. (100.0%)**  
**VIALE SHAKESPEARE 47**  
**00144 ROMA, IT**

72 Inventor/es:

**DE SANTIS, RITA y**  
**NUZZOLO, CARLO ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 625 815 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Avidina oxidada con alto tiempo de residencia en los tejidos tratados

**Campo de la invención**

5 La invención descrita en esta memoria se refiere a avidinas modificadas útiles para unir compuestos biotinilados o células y mantenerlas en un sitio que necesita terapia.

**Fundamento de la invención**

El sistema de avidina-biotina se ha conocido durante muchos años como una herramienta excepcional para estudios cualitativos y cuantitativos en interacciones entre pequeñas moléculas y receptores biológicos (Wilchek, M., *et al.*, *Immunol. Today*, **1984**, 6, 39).

10 La avidina es una glicoproteína de aproximadamente 68 kDa presente en la clara de huevo y que muestra alta afinidad por la vitamina H biotina. Su constante de disociación ( $K_d \sim 10^{-15}$  M) es la más baja conocida en la naturaleza (Green N.M., *et al.*, *Biochem. J.*, **1970**, 118, 67; Green, N.M., *Adv. Protein Chem.*, **1975**, 29, 85). Está compuesta por cuatro subunidades de idéntica secuencia de aminoácidos, cada una de las cuales puede unirse potencialmente a una molécula de biotina. La glicosilación representa aproximadamente el 10% de su peso molecular con un promedio de cuatro a cinco residuos de manosa y tres residuos de N-acetilglucosamina por subunidad (Bruch R.C., *et al.*, *Biochemistry*, **1982**, 21, 5334).

En 1988, se presentó un estudio respecto a la interacción entre derivados de biotina radiomarcados y avidina (Garlick R.K., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 210).

20 En el documento WO04093916 en el nombre del Solicitante, se describió una terapia perioperativa de dos etapas de tumores sólidos como una nueva forma de braquiterapia. La primera etapa implicaba la administración en el área operada de un anticuerpo específico biotinilado seguido por la inyección de avidina nativa o PEG-ilada para construir un "receptor artificial". Después, en la segunda etapa, el agente anticancerígeno apropiado acoplado a la biotina se administraba sistémicamente. La segunda etapa necesitaba realizarse en las 4 a 72 horas desde la eliminación quirúrgica del tumor. Sin embargo, no se proporcionaban sugerencias de avidinación directa a través de enlace covalente de avidina al tejido considerado.

25 Las aplicaciones clínicas de esta braquiterapia de dos etapas que usa avidina en la primera etapa y biotina-DOTA radiomarcada (ST2210) en la segunda etapa, probaron que es efectiva en el reparto de irradiación parcial al área operada quirúrgicamente en pacientes de cáncer de mama (Paganelli G., *et al.*, *The Breast*, **2007**, 16, 17; Paganelli G., *et al.*, *Clin. Canc. Res.*, **2007**, 13, 5646). La dosis de radiación liberada al cuadrante operado quirúrgicamente, en 11 pacientes, fue un promedio de 20 Gy para una dosis administrada de 100 mCi. Este aumento representa aproximadamente 1/3 de los 60 Gy esperados repartidos a este tipo de pacientes por la Radioterapia de Haz Externo (EBR) estándar actual.

35 Los usos de construcciones de anticuerpo de estreptavidina con conjugados de radionúclidos de biotina en el tratamiento de pacientes con gliomas malignos, y de anticuerpos biespecíficos con radionúclidos de hapteno en la terapia de tumores que expresan el antígeno carcinoembrionario se presentaron recientemente (Goldenberg, D.M., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **2006**, 24, 823). Sin embargo, en bastantes casos la toxicidad renal apareció debido a la dosis demasiado elevada que pasó al riñón.

40 Uno de los principales problemas cuando se trata con la avidina, reside en su rápido aclaramiento del cuerpo. Últimamente, los esfuerzos de la investigación se enfocaron en descubrir "avidina modificada" con una mayor vida media. Una de dichas aproximaciones que consiste en unir la proteína por medio de grupos amino libres a monometoxipoli(etilenglicol), dio por resultado una vida media en plasma prolongada de la avidina modificada con el 8% de la dosis inyectada i.v. aún presente en el tumor después de 5 horas y el 6% después de 72 horas cuando la avidina estaba acoplada a PEG-20 kDa (Caliceti P., *et al.*, *J. Control. Release*, **2002**, 83, 97).

45 Un estudio farmacocinético que demuestra la influencia del tamaño del resto PEG resaltó el hecho de que cuanto más pesada es la unidad PEG más corta es la vida media, mientras que el grado de afinidad de biotina-avidina estaba siguiendo una tendencia contraria (Salmaso S., *et al.*, *Biochim. Phys. Acta*, **2005**, 1726, 57).

50 Otro estudio de propiedades farmacocinéticas y de unión a biotina en una avidina PEG-ilada diferente mostró que 7 restos PEG por proteína avidina era la mejor relación, permitiendo el aumento de la vida media en plasma y reduciendo la inmunogenicidad de la avidina. Sin embargo, no se dieron detalles en el modelo animal con respecto a la acumulación de fármaco biotinilado en los tumores (Chinol M., *et al.*, *Br. J. Cancer*, **1998**, 78, 2, 189).

Como una alternativa a la PEG-avidina, se han investigado los polímeros termosensibles. La poli(N-isopropilacrilamida-co-acrilamida)-avidina mostró un mayor tiempo de residencia en la corriente sanguínea en comparación con la avidina y menor acumulación en el hígado (Salmaso S., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **2007**, 340, 20). Sin embargo, tampoco en este caso se presentaron detalles en el modelo animal con respecto a la acumulación de

fármaco biotilado en los tumores.

Desafortunadamente, hasta ahora, no está disponible ningún método eficiente y selectivo para localizar de forma específica agentes terapéuticos.

5 Por lo tanto, la mejora de la terapia anticancerígena tiene aún una gran necesidad y es un área principal de esfuerzos para las compañías farmacéuticas.

La interacción de unión de avidina-biotina es dependiente de la parte de proteína. De hecho, la avidina desglucosilada conserva la capacidad de unión de la biotina (Hiller Y., *et al*, *Biochem. J.*, **1987**, 248, 167; Rosebrough S.F., *et al.*, *J. Nucl. Med.*, **1996**, 37, 8, 1380).

10 La acumulación aumentada y la permanencia de un agente terapéutico en el área a tratar podrían conseguirse a través de la avidinación del tejido con una avidina modificada dotada de una mayor permanencia en el tejido en comparación con la avidina de tipo salvaje.

15 Dicha estrategia evitaría la necesidad de administración sistémica de avidina y en consecuencia prevendría cualquier efecto secundario relacionado con dicha terapia. Además, una avidinación aumentada del tejido relevante daría por resultado un tratamiento menos tóxico debido a la menor distribución del agente anticancerígeno en órganos no relevantes y dosis reducida de agente anticancerígeno para obtener el mismo efecto que con la avidina de tipo salvaje.

Se ha encontrado actualmente que oxidando la parte glicosilada de la avidina, puede obtenerse la avidinación estable del tejido tumoral circundante, permitiendo que un agente anticancerígeno biotilado se concentre mejor en dicha región.

## 20 Descripción de la invención

La presente invención implica una avidina oxidada químicamente capaz de interactuar con tejidos in vivo, a través de un enlace químico covalente reversible, de una forma que retrasa su difusión. Dicha avidina oxidada se administra durante la etapa quirúrgica o inyectando un órgano o tejido seleccionado que necesita la terapia.

25 La oxidación de la avidina por medio de 10 mM de peryodato sódico se presentó recientemente (documento US20020137125). En el último, los autores acoplaron la avidina oxidada con fosfopentamano-hidrazina para obtener un derivado de imina altamente fosforilado que podría administrarse entonces al paciente para modificar la enzima lisosomal, mejorando esto la eficacia de la terapia de sustitución de enzimas de las enfermedades lisosomales. Es digno de mención que la formación de imina no interviene in vivo. También tiene que notarse que no se presenta actividad de dicha avidina modificada es esa solicitud.

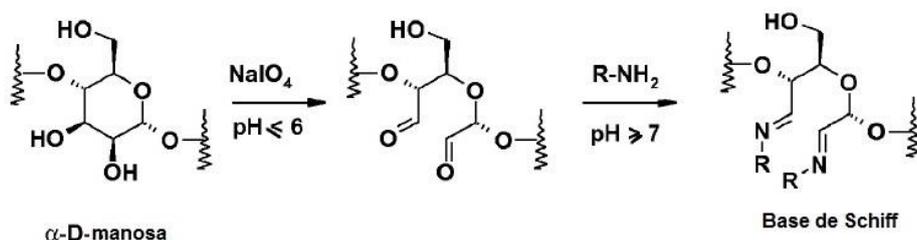
30 En particular, la presente invención se refiere a una avidina oxidada, obtenida por oxidación de los restos de azúcar de la glicoproteína, que muestra mayor permanencia en los tejidos en comparación con la avidina de tipo salvaje (WTavidina) mientras que minimiza los efectos secundarios encontrados cuando se usan las proteínas de avidina modificada presentadas anteriormente.

35 La unión al tejido de la avidina oxidada es altamente homogénea y no depende como en IART de la capacidad de la avidina cargada de forma positiva para localizar el tumor y los tejidos inflamatorios. Por lo tanto, la acción de la avidina oxidada no está limitada a la interacción específica con células tumorales permitiendo así la avidinación de los tejidos que rodean los tumores eliminados quirúrgicamente que se sabe que contienen células tumorales libres no fácilmente accesibles para dirigirse al objetivo con la avidina de tipo salvaje.

40 Una primera realización de la presente invención se refiere a una avidina de tipo salvaje modificada químicamente por medio de la apertura anular oxidativa del azúcar piranosídico, generando así restos aldehído que interactúan con residuos amino presentes en el tejido de interés.

45 Los grupos CHO, a pH ácido (por debajo de 6,0), son esencialmente inertes frente a las proteínas NH<sub>2</sub> porque está presente la forma NH<sub>3</sub><sup>+</sup> protonada. Sin embargo a pH≥7, los grupos CHO reaccionan con los residuos NH<sub>2</sub> de la proteína para formar bases de Schiff. Un ejemplo de la oxidación química de un residuo de manosa representativo de la avidina de tipo salvaje y la siguiente reacción de los grupos CHO de nueva formación con los grupos amino (R-NH<sub>2</sub>, donde R es un residuo de proteína del tejido) se da en el Esquema 1.

Esquema 1



Esta oxidación del azúcar se alcanza según el método bien conocido basado en la reacción de la avidina nativa con peryodato sódico (Zaborsky, O.R., *et al.*, *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, **1974**, 61, 1, 210; Green, N.M. *Biochem. J.*, **1963**, 89, 599).

- 5 La oxidación de avidina sin embargo, se sabe que da por resultado el daño de algunos residuos de aminoácidos de la proteína, es decir, la oxidación de triptófano que está implicada en el sitio de unión a la biotina, provocando una menor afinidad hacia la biotina y/o derivados de biotina (documento US20040191832; Green, N.M., *Biochem. J.*, **1963**, 89, 599).

10 Se ha encontrado actualmente que la unión de avidina al ligando de baja afinidad ácido 4-hidroxiazobenceno-2'-carboxílico (HABA), antes de la etapa de oxidación, confiere a la primera una conformación que evita la oxidación de los residuos de triptófano como se reveló por el análisis de los espectros UV de dichos derivados. La disminución de las inflexiones características a 282 y 291 nm, en los espectros UV se relaciona estrictamente con el grado de oxidación del triptófano; mientras que un aumento de absorbancia en la región de 250-260 nm es característico de la formación de un oxindol sustituido.

15 Los espectros de absorción de la avidina oxidada (OXavidina) y avidina oxidada saturada con HABA (OXavidina<sub>HABA</sub>), en comparación con el de la avidina de tipo salvaje (WTavidina) indican que el uso de HABA para proteger los sitios de unión de la biotina durante la oxidación disminuye en gran medida la tasa de daño del triptófano (figura 1). La avidina oxidada presenta un espectro UV en donde la absorbancia a 282 y 291 nm no presenta la inflexión característica de la oxidación de residuos de triptófano con respecto a la observada para la WTavidina.

20 La avidina oxidada presenta un espectro UV en donde la absorbancia a 250-260 nm no presenta ningún aumento con respecto al observado para la WTavidina.

Otra realización aún preferida de esta invención es la de un método de oxidación de avidina y/o derivados de avidina en presencia del ligando HABA que evita la oxidación de los residuos de triptófano.

25 En estricto acuerdo con el efecto protector de HABA, la OXavidina<sub>HABA</sub> muestra propiedades estructurales y termodinámicas muy similares a la WTavidina. La estabilidad térmica y los cambios conformacionales se determinaron por espectroscopia de dicroísmo circular antes y después de la oxidación, con y sin 4 equivalentes de biotina. Las curvas de fusión se grabaron siguiendo la disminución de la señal dicroica a 225 nm en el intervalo de temperatura de 25-95°C. El punto de inflexión y la pendiente (p) de las curvas sigmoideas se calcularon por medio del modelo de ajuste de Boltzman del software Origin® 7.0 y representan el punto de transición a través de la condición desnaturalizada.

30 Para cada compuesto específico, la estabilidad térmica corresponde a la temperatura que marca el punto de inflexión de la correspondiente curva registrada en el intervalo de temperatura de 25-95°C.

35 Los datos (tabla 1) indican que la oxidación disminuye la estabilidad térmica, como se determina por la disminución en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y por la pendiente (p) de la curva sigmoidea de la OXavidina en comparación con la WTavidina (74,3 frente a 79,0°C, y 8,9 frente a 14,7, respectivamente).

De forma sorprendente, el efecto de desestabilización es casi insignificante cuando la oxidación se realiza en avidina protegida con HABA como se confirma por los valores de  $T_m$  y p de la OXavidina<sub>HABA</sub> y la avidina, 78,1 frente a 79,0°C, y 11,2 frente a 14,7, respectivamente.

40

Tabla 1

	T <sub>m</sub> (°C)	p*
Avidina	79,0 ± 0,1	14,7 ± 0,3
Avidina + 4 eq de biotina	>95	n.a.
OXavidina	74,3 ± 0,1	8,9 ± 0,1
OXavidina + 4 eq de biotina	86,3 ± 0,2	20,7 ± 1,1
OXavidina <sub>HABA</sub>	78,1 ± 0,3	11,2 ± 0,4
OXavidina <sub>HABA</sub> + 4 eq de biotina	>95	n.a.

\*Pendiente de la curva sigmoidea; n.a. = no aplicable

5 Aunque la desnaturalización térmica es irreversible tanto para la OXavidina<sub>HABA</sub> como para la OXavidina cuando se calienta sin biotina, solo la OXavidina<sub>HABA</sub> recupera su estructura secundaria, de forma similar a la WTavidina, cuando se calienta/enfría en presencia de biotina (datos no mostrados). Estos descubrimientos confirman que la saturación HABA es una forma muy efectiva para conservar la conformación de avidina sometida a oxidación química y para explicar la capacidad de unión a la biotina consiguientemente retenida.

La avidina oxidada presenta una estabilidad térmica mayor o igual a 78°C.

10 Preferiblemente la avidina oxidada presenta una estabilidad térmica mayor o igual a 78°C con una pendiente de la curva sigmoidea mayor que 10.

El descubrimiento anterior se corrobora también por la capacidad de unión de la avidina oxidada (OXavidina<sub>HABA</sub>) al aducto biotinilado ST2210 que es similar a la de la WTavidina como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

	Condiciones de oxidación	Relación molar de CHO/avidina ± DE (N)	% de unión de biotinaDOTA ± DE (N)	Permanencia en el tejido % de ID/100 mg ± DE	
				24 h (N)	1 semana (N)
WTavidina	Sin oxidación	<LoQ (5)	100 <sup>@</sup>	2,4 ± 0,4 (5)	0,46 ± 0,08 (4)
OXavidina	NaIO <sub>4</sub> 1 mM	5,6 ± 0,8 (5)	77,2 ± 0,9 (4)	3,1 ± 0,7 (1)	0,16 ± 0,03 (1)
	NaIO <sub>4</sub> 5 mM	7,5 ± 0,8 (5)	55,7 ± 2,2 (4)	6,3 ± 0,3 (1)	0,99 ± 0,25 (1)
	NaIO <sub>4</sub> 10 mM	8,4 ± 1,0 (6)	50,9 ± 2,4 (6)	17,4 ± 2,8 (3)	9,7 ± 3,2 (3)
	NaIO <sub>4</sub> 20 mM	11,5 ± 1,5* (7)	49,1 ± 2,1 (6)	19,1 ± 2,0 (4)	11,4 ± 1,3 (3)
	NaIO <sub>4</sub> 40 mM	10,9 ± 2,6 (5)	44,5 ± 0,9 (4)	NE	NE
OXavidina <sub>HABA</sub>	NaIO <sub>4</sub> 1 mM + HABA 1 mM	4,0 ± 0,8 (3)	99,0 ± 0,2 (3)	NE	NE
	NaIO <sub>4</sub> 5 mM + HABA 1 mM	7,1 ± 1,6 (4)	95,0 ± 1,7 (3)	NE	NE
	NaIO <sub>4</sub> 10 mM + HABA 1 mM	8,5 ± 1,3 (5)	86,3 ± 1,6** (3)	18,4 ± 2,2 (2)	9,0 ± 1,2 (2)
	NaIO <sub>4</sub> 20 mM + HABA 1 mM	12,9 ± 2,3 # (6)	81,4 ± 1,0#*** (4)	18,5 ± 0,5 (4)	11,7 ± 2,3 (3)
	NaIO <sub>4</sub> 40 mM + HABA 1 mM	9,8 ± 1,9 (4)	73,0 ± 0,6 (3)	NE	NE

N = número de experimentos independientes; DE = Desviación Estándar; NE = No Ensayado

15 <sup>@</sup>El valor experimental de 97,4 ± 0,5 obtenido con biotinaDOTA (ST2210) en comparación con la biotina libre mediante el ensayo de HABA se asume como el 100% del valor de referencia para avidinas modificadas; \*p<0,05 frente a 10 mM; #p<0,01 frente a 10 mM (Anova de una dirección seguido por Student-Newman-Keuls); \*\*p<0,001

frente a lo mismo sin HABA (Anova de dos direcciones seguido por Bonferroni).

- 5 La avidina oxidada obtenida según el método optimizado (OXavidina<sub>HABA</sub>) muestra propiedades mejoradas en comparación con la avidina oxidada preparada sin protección HABA con respecto a la unión de ST2210 mientras mantiene alta permanencia en el tejido tratado (músculo de la pata de ratones después de inyección i.m.). De hecho, cuando la avidina se oxida con 10 mM de NaIO<sub>4</sub>, su capacidad de unión con respecto a ST2210, es mayor si HABA se añade antes de la oxidación (86,3% en comparación a solo 50,9% para la avidina oxidada correspondiente en ausencia de HABA). Un resultado similar se obtiene cuando la oxidación se da en presencia de una mayor concentración de peryodato sódico (20 mM) (81,4% frente a 49,1%).
- 10 La avidina oxidada presenta una unión con ST2210 mayor o igual que 75% con respecto al 97,4% obtenido para WTavidina.
- Además, la permanencia en el tejido de la avidina oxidada en la pata trasera de los ratones, a pesar del hecho de que dicha oxidación se da en presencia o no de HABA, es mucho mayor que para la WTavidina. Este comportamiento está estrictamente correlacionado con la presencia de grupos CHO en las cadenas laterales glicosiladas de la avidina.
- 15 En la avidina oxidada según la presente invención, aproximadamente de 8 a 15 residuos de CHO por avidina (como se estima por el método de Purpald) se producen después de la oxidación con NaIO<sub>4</sub> 10 y 20 mM.
- Preferiblemente los derivados de avidina oxidada “protegidos con HABA” (OXavidina<sub>HABA</sub>) mantienen una alta capacidad de unión a ST2210 y muestran permanencia en el tejido, a las 24 horas y a la semana después de la inyección, que correlacionan con el número de grupos CHO.
- 20 La caracterización físico-química, por medio de la Calorimetría de Valoración Isotérmica (ITC), de dicha interacción de avidina/biotina reveló que ST2210 es capaz de unirse a WTavidina y OXavidina<sub>HABA</sub> de una manera comparable como se demuestra por las constantes de asociación (K<sub>A</sub>) y el cambio de entalpía (ΔH) (3,45 frente a 2,50 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>, y -1,48 frente a -1,71 x 10<sup>4</sup> kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente). Por el contrario, la interacción ST2210/OXavidina muestra menor K<sub>A</sub> (6,45 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>) y mayor ΔH (-0,79 x 10<sup>4</sup> kcal mol<sup>-1</sup>).
- 25 Según los datos de unión de ST2210 a avidinas oxidadas, en el error experimental, la estequiometría determinada de interacción es de 3,0, 1,7 y 1,2 moléculas de ST2210 por molécula de WTavidina, OXavidina<sub>HABA</sub> y OXavidina, respectivamente.

Tabla 3

	N	K <sub>A</sub> M <sup>-1</sup>	ΔH kcal mol <sup>-1</sup>	ΔS cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
WTavidina	3,0 ± 0,016	3,45E6 ± 3,07E5	-1,48E4 ± 114,0	-19,6
OXavidina NaIO <sub>4</sub> 20 mM	1,2 ± 0,012	6,45E5 ± 5,69E4	-0,79E4 ± 117,8	0,16
OXavidina <sub>HABA</sub> NaIO <sub>4</sub> 1 mM	2,5 ± 0,008	4,58E6 ± 2,49E5	-1,29E4 ± 56,2	-12,7
OXavidina <sub>HABA</sub> NaIO <sub>4</sub> 5 mM	1,9 ± 0,012	5,42E6 ± 5,90E5	-1,56E4 ± 145,0	-21,6
OXavidina <sub>HABA</sub> NaIO <sub>4</sub> 10 mM	1,7 ± 0,008	3,34E6 ± 2,12E5	-1,60E4 ± 109,9	-23,7
OXavidina <sub>HABA</sub> NaIO <sub>4</sub> 20 mM	1,5 ± 0,007	2,50E6 ± 1,32E5	-1,71E4 ± 113,7	-28,0

- 30 La avidina oxidada, según la presente invención, mantiene esencialmente la capacidad de unión a la biotina de la avidina de tipo salvaje mientras adquiere la propiedad de interactuar de forma reversible con las proteínas del tejido, dando por resultado así un candidato ideal para el uso en braquiterapia como en el IART<sup>®</sup>.
- La avidina oxidada según la presente invención puede administrarse en la etapa intraoperativa, generando así un “receptor artificial” para el posterior agente anticancerígeno.
- 35 Una realización más preferida de la presente invención es proporcionar una avidina oxidada químicamente para usarse como un primer agente de braquiterapia, dotada de alta permanencia en los tejidos tratados, en combinación con un segundo agente dotado con afinidad por dicha primera avidina oxidada.

Una realización incluso más preferida de la presente invención es proporcionar una avidina oxidada químicamente para usarse como un primer agente de braquiterapia, dotada de alta permanencia en los tejidos tratados, en combinación con un segundo agente anticancerígeno dotado de afinidad por dicha primera avidina oxidada.

5 Otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene dicha avidina químicamente modificada como el primer ingrediente y un agente terapéutico biotinilado como el segundo ingrediente activo.

En una realización preferida de la invención, el segundo ingrediente activo de la composición farmacéutica anterior es un agente anticancerígeno biotinilado.

10 Agente anticancerígeno significa un agente capaz de luchar contra los tumores. Una lista no exhaustiva de agentes anticancerígenos consiste en fármacos quimioterapéuticos, compuestos radiomarcados, células efectoras, toxinas, citoquinas y células anticancerígenas.

En otra realización preferida de la invención, la terapia tendrá la forma de radioterapia.

Otra realización preferida de la presente invención consiste en la preparación de un kit útil para la braquiterapia de mama, músculo, hígado, páncreas, vejiga, cerebro, pulmón, próstata, ovarios, ojos y otros órganos.

En una realización preferida del kit, los dos ingredientes están en dos recipientes separados.

15 El recipiente de avidina modificada químicamente consistiría en una cantidad adecuada de producto, formulado en una disolución ácida compatible o liofilizado con excipientes adecuados para formar una torta.

20 Preferiblemente, el recipiente mencionado anteriormente tendrá la forma de una jeringa especial adecuada para administraciones sucesivas de múltiples volúmenes precisos en los márgenes de la resección o residuos de tejido enfermo que no pueden eliminarse quirúrgicamente por la infiltración de órganos vitales. De forma conveniente, el recipiente puede estar además en la forma adecuada para la administración de avidina modificada químicamente como un pulverizado.

Preferiblemente, los diversos recipientes, conteniendo ya las dosis de los ingredientes individuales, se fabricarán como un paquete único que lleva las instrucciones para los modos de administración.

Incluso más preferiblemente, los diversos recipientes tienen la forma de una jeringa.

25 En otra realización particularmente preferida, el kit para usar en braquiterapia, que, como en IART<sup>®</sup>, es adecuado para la administración locoregional secuencial del primer ingrediente y posterior administración sistémica o local del segundo ingrediente.

30 El segundo ingrediente de la composición de esta invención puede administrarse mediante cualquier número de rutas que incluyen, aunque no están limitadas a, medios oral, intravenoso, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, aplicaciones transdérmica o transcutánea, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual, intravaginal, rectal o localmente en el tejido enfermo.

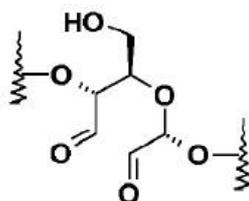
35 Hay casos clínicos donde la braquiterapia se realiza administrando radioisótopo directamente en la masa tumoral (es decir, tumores cerebrales inoperables como se describe en Julow J., *et al.*, *Prog. Neurol. Surg.*, **2007**, *20*, 303) u órganos afectados por tumor (es decir, próstata como se describe en Saito S, *et al.*, *Int. J. Clin. Oncol.*, **2007**, *12*, 395). En tal caso un dispositivo de braquiterapia ideal sería uno que muestre distribución homogénea y estabilidad en el sitio tratado.

En base a datos experimentales, se ha encontrado que la avidinación del tejido se da en diferentes tejidos como músculo, mamario (mostrado en los actuales ejemplos) además de en tejido cerebral.

40 En aún otra realización particularmente preferida, el agente terapéutico biotinilado de avidina oxidada complejo se obtendrá mezclando los dos ingredientes y posteriormente se administrará al paciente.

La composición de la presente invención constituye una medicina útil para la terapia de tumores sólidos operables o no, o no completamente eliminables, tales como, por ejemplo aunque no de forma exclusiva, cánceres de mama, páncreas, pulmón, pleura, peritoneo, cara y cuello, vejiga, cerebro, próstata, ovarios, ojos y otros órganos como se describe en la solicitud de patente WO2004/093916 presentada en el nombre del Solicitante.

45 Según una realización preferida de la invención la avidina oxidada obtenida por el procedimiento de la invención puede definirse como una avidina modificada químicamente, en que al menos uno de los residuos de manosa se ha sustituido por un residuo de la siguiente fórmula (I)



Fórmula I

Un objeto adicional de la presente invención es composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, en combinación con excipientes y/o diluyentes farmacológicamente aceptables.

5 El procedimiento para la preparación de la composición farmacéutica se caracteriza por mezclar la avidina modificada químicamente con excipientes adecuados, estabilizadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Un excipiente es una sustancia inerte que se añade a un fármaco para proporcionar masa.

La composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración de un agente terapéutico. Dichos vehículos incluyen anticuerpos y otros polipéptidos, genes y otros agentes terapéuticos tales como liposomas, con tal que el vehículo pueda administrarse sin toxicidad indebida.

10 Los vehículos adecuados pueden ser grandes macromoléculas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y partículas de virus inactivas.

Una discusión minuciosa de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

15 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol.

Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, sustancias tamponantes de pH, y similares, pueden estar presentes en dichas composiciones. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como tortas de liofilización, comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para la ingestión por el paciente.

20

Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos.

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis únicas o un programa de dosis múltiples.

La dosis se determinará por un experto en el campo para así repartir al tejido diana una cantidad que ejerza una acción terapéutica efectiva.

25 Un intervalo de dosis general podría estar entre 10-100 ml de disolución de avidina oxidada a una concentración de 3-5 mg/ml. El volumen de dosis dependerá del volumen del tejido diana a tratar, es decir, 30 ml para un tratamiento típico de una región de la mama alrededor del sitio de una cuadrantectomía (Paganelli G., *et al.*, *The Breast*, **2007**, 16, 17) o hasta 100 ml para el tratamiento de una cavidad peritoneal.

30 La caracterización bioquímica de la avidina oxidada incluye la estimación de grupos CHO mediante el método calorimétrico Purpald<sup>®</sup> conocido por el experto en el campo (Avigad G., *Anal. Biochem.*, **1983**, 134, 2, 499), usando propionaldehído como un patrón.

### Descripción de los dibujos

Figura 1:

Muestra los espectros UV de tres formas diferentes de avidina.

35 Figura 2:

Las curvas A, B y C se refieren a los perfiles de elución de WTavidina, OXavidina<sub>HABA</sub> y OXavidina respectivamente en cromatografía de exclusión de tamaño (columna Biosep-SEC-S3000 (Phenomenex<sup>®</sup>, 300x7,8 mm, volumen: 14,3 ml) usando una condición isocrática con un tampón de acetato sódico 100 mM pH 5,5 y NaCl 0,15 M a un caudal de 1 ml/min a temperatura ambiente. Los dos últimos se obtuvieron a partir de WTavidina mediante oxidación usando NaIO<sub>4</sub> (20 mM). La relación 280/260 se refiere a la integridad de la avidina con respecto a la oxidación de residuos de triptófano y formación de oxindol.

40

## Figura 3:

Muestra la biodistribución de avidina oxidada en ratones tratados después de la administración intramuscular. En particular la Figura 3a indica que la cantidad de avidina oxidada en la pata tratada es más del doble de la avidina nativa después de 1 hora desde la inyección. La diferencia aumenta con el tiempo: la avidina nativa es casi indetectable después de 24 y 48 horas, mientras la avidina oxidada representa aproximadamente el 22% y 15% de la dosis inyectada/100 mg de tejido, respectivamente. La concentración mayor de avidina oxidada en comparación con avidina de tipo salvaje en la pata tratada se asocia, como consecuencia, a una menor distribución de avidina oxidada y una mayor distribución de avidina de tipo salvaje en los órganos que no son diana, particularmente en la primera hora, como se muestra para la sangre, riñón e hígado en la Figura 3b, c y d, respectivamente. La Figura 3e muestra la distribución de avidina oxidada y la avidina de tipo salvaje en las patas controlaterales.

## Figura 4:

Muestra la permanencia en el tejido de WTavidina y OXavidina<sub>HABA</sub> radiomarcadas con <sup>125</sup>I en las patas tratadas y controlaterales hasta 14 semanas. Dicho gráfico indica que, en referencia al nivel de la hora 1, la vida media en el tejido de la OXavidina<sub>HABA</sub> es aproximadamente 2 semanas en oposición a las 2 horas para la WTavidina.

## Figura 5:

Muestra la permanencia en el tejido de WTavidina, PEGavidina y OXavidina<sub>HABA</sub> después de 24 horas desde la inyección en una pata trasera de ratones Balb/c con 45 µg (en 15 µl) de WTavidina, PEGavidina u OXavidina marcadas con <sup>125</sup>I formuladas en tampón de acetato 100 mM pH 5,5. La radioactividad en la pata tratada se midió por contador gamma (Cammerra Packard, Schwadorf Austria).

## Figura 6:

Muestra las secciones obtenidas a partir de músculos de ratones Balb/c inyectados con WTavidina (panel a) u OXavidina<sub>HABA</sub> (panel b) y teñidos con anticuerpo anti avidina para la inmunofluorescencia: fluido ascítico anti avidina de ratón (A5680 carga 064K4826, Sigma Aldrich), seguido por Alexa Fluor 488 anti ratón (carga 99E2,2, Molecular Probes). El panel a muestra una localización punteada débil mientras las secciones de los músculos inyectados con OXavidina<sub>HABA</sub> muestran una distribución homogénea fuerte. En ambos casos la avidina se localizó en el intersticio.

## Figura 7:

Muestra la permanencia en varios puntos temporales de <sup>111</sup>In-ST2210 inyectado i.v. en la pata trasera de ratones Balb/c que se trataron 48 horas antes con WTavidina u OXavidina<sub>HABA</sub> (panel a). Los paneles b, c y d se refieren a la captación de <sup>111</sup>In-ST2210 en el hígado, riñón y bazo, respectivamente, después de la inyección i.v. de <sup>111</sup>In-ST2210. El panel e muestra la captación de <sup>111</sup>In-ST2210 después de 48 horas desde la avidinación del tejido. En el segundo escenario del caso (<sup>111</sup>In-ST2210 repetido) los animales recibieron en primer lugar una dosis de ST2210 frío y 24 horas después una segunda dosis de <sup>111</sup>In-ST2210.

## Figura 8:

Muestra la residencia en el tejido de los complejos de WTavidina u OXavidina<sub>HABA</sub> con ST2210 una semana después de la inyección en una pata trasera.

## Figura 9:

Muestra la residencia en el tejido cerebral de la OXavidina<sub>HABA</sub> 24 horas después de la inyección a través del lado izquierdo del cráneo.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, sin limitarla.

40 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Síntesis y caracterización bioquímica de avidinas oxidadas

El método del procedimiento de oxidación comprende las siguientes etapas sucesivas:

a) incubado de avidina de tipo salvaje pre-mezclada con un exceso molar de HABA, con un agente oxidante tal como peryodato sódico 10-20 mM en tampón de acetato 50-100 mM a pH por debajo de 6,0 durante 1-5 horas a 4°C o a temperatura ambiente;

b) bloqueo de la reacción y purificación por eliminación del agente oxidante y HABA por cromatografía, ultrafiltración, diálisis u otros métodos de purificación conocidos por el experto en el campo; y

c) liofilizado o formulación a un pH ácido.

La avidina oxidada se analizó adicionalmente por el tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna biosep-SEC-S3000 (Phenomenex®, 300x7,8 mm, volumen: 14,3 ml) usando una condición isocrática con un tampón de acetato sódico 100 mM pH 5,5 y NaCl 0,15 M a un caudal de 1 ml/min a temperatura ambiente.

- 5 Como se muestra en la Figura 2 la elución de una avidina oxidada aparece ligeramente retrasada en comparación con la avidina nativa.

#### Ejemplo 2: Biodistribución de avidina oxidada en ratones tratados

- 10 La avidina oxidada (OXavidina) se evaluó para la permanencia en el tejido tratado, para su biodistribución en órganos no tratados, además de para su capacidad para capturar <sup>111</sup>In-ST2210 en un modelo de ratón que simula IART® en comparación con la avidina de tipo salvaje (WTavidina).

El modelo animal de IART® se estableció realizando un corte quirúrgico en una pata trasera de un ratón, infiltrando avidina radiomarcada en los márgenes quirúrgicos y tejidos circundantes y midiendo la radioactividad en la pata tratada en puntos temporales diferentes después de la administración. En un grupo paralelo de ratones, la avidina radioactiva se infiltró en la pata sin cirugía.

- 15 La cantidad de radioactividad, después de 1 y 24 horas desde la administración fue similar en los animales tratados quirúrgicamente y no tratados quirúrgicamente. Por lo tanto, se realizaron estudios adicionales infiltrando avidina sin cirugía. La WTavidina se marcó con <sup>125</sup>I (Perkin Elmer, Italia) según el método Yodo-Gen (Pierce, Rockford, IL). La avidina marcada se separó del yodo libre por cromatografía en una columna PD-10 (Amershan Biosciences, Uppsala, Suecia) y se oxidó como se describe anteriormente en el Ejemplo 1 sin ninguna protección HABA previa.

- 20 El ST2210 descrito en la solicitud de patente WO 02/066075 (página 18, pentahidrocloruro de ácido 1-[2-[6-[5-[(3aS,4S,6aR)-hexahidro-2-oxo-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]-1-pentilamino]-1-hexilamino]-2-oxoetil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético) se marcó con <sup>111</sup>In (Perkin Elmer, Italia) según un método descrito anteriormente (Urbano N., *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, *34*, 68).

- 25 Los ratones Balb/c nu/nu (Harlan Udine, Italia) se dividieron en 8 grupos de 5 ratones. Se administraron WTavidina u OXavidina marcadas con <sup>125</sup>I de forma intramuscular (i.m.) en una pata trasera de cada ratón (400 µg/ratón en 40 µl) y después de 1, 24 o 48 horas los ratones recibieron de forma intravenosa (i.v.) 16 µg de <sup>111</sup>In-ST2210.

Los ratones se sacrificaron 1, 24 o 48 horas después de la administración de <sup>111</sup>In-ST2210 y se recogieron muestras de las patas tratadas y controlaterales, riñón, hígado y sangre y se contaron en un contador gamma (Camberra Packard, Schwadorf, Austria).

- 30 Como se muestra en la Figura 3a la cantidad de avidina oxidada en la pata trasera es más del doble que la avidina después de 1 hora desde la inyección. La diferencia aumenta con el tiempo: la WTavidina es casi indetectable después de 24 y 48 horas mientras que la OXavidina era aproximadamente del 22% y 15% de la dosis inyectada/100 mg de tejido, respectivamente. La mayor concentración de avidina oxidada en comparación con la avidina de tipo salvaje en la pata trasera estaba asociada, como consecuencia, a una menor distribución de avidina oxidada y una mayor distribución de avidina de tipo salvaje en los órganos que no son diana, particularmente en la primera hora, como se muestra para la sangre, riñón e hígado en la Figura 3b, c y d, respectivamente. La Figura 3e muestra la distribución de OXavidina y WTavidina en la pata controlateral.

- 35 Ya que IART®, como se describe en la solicitud de patente WO2004/093916, prevé la administración local de WTavidina (inyección intraoperativa) seguida por la inyección intravenosa del agente anticancerígeno después de 4-72 horas, es evidente que el uso de una avidina modificada químicamente, como la del ejemplo de la presente invención, ofrece grandes ventajas.

#### Ejemplo 3: Permanencia en el tejido a largo plazo de las avidinas de tipo salvaje y oxidada

- 45 Los ratones Balb/c nu/nu (Charles River, Lecco Italia) se inyectaron en una pata trasera con 45 µg en 15 µl o bien de WTavidina marcada con <sup>125</sup>I o de OXavidina marcada con <sup>125</sup>I formuladas en tampón acetato 100 mM pH 5,5 y a los puntos temporales indicados los animales se sacrificaron y la radioactividad en la pata tratada además de en otros órganos que no son diana se midió por contador gamma (Camberra Packard, Schwadorf Austria).

La permanencia en el tejido de la WTavidina y la OXavidina<sub>HABA</sub> se monitorizó hasta 14 semanas. La vida media en el tejido de la OXavidina, cuando se refiere al nivel de hora 1, se encontró que era aproximadamente 2 semanas al contrario que las 2 horas para la WTavidina (figura 4).

- 50 Ejemplo 4: Biodistribución de avidina oxidada en el tejido mamario

La OXavidina<sub>HABA</sub> se evaluó para su permanencia en el tejido mamario en comparación con la WTavidina. Se administraron 50 µg (en 15 µl) de WTavidina u OXavidina<sub>HABA</sub> marcadas con <sup>125</sup>I, preparadas según el método general descrito en el ejemplo 1, en la región de la mama por debajo del pezón (3 mamas por cada avidina) de conejos (Francucci Enzo, Rieti, Italia). Los animales se sacrificaron después de 24 h desde la inyección y las

muestras de tejido del área inyectada de aproximadamente 200 mg se recogieron y se contaron en un contador gamma como se describe anteriormente. Los datos son el promedio (+/- DE) de 3 determinaciones.

- 5 Los datos en la Tabla 4 muestran que el 8,5 y 65,8% de ID de WTavidina y OXavidina<sub>HABA</sub>, respectivamente se encuentran después de 24 horas en el tejido mamario. Estos datos confirman la permanencia más alta de la OXavidina<sub>HABA</sub>, en comparación con la WTavidina, observada anteriormente en el tejido muscular del ratón, en el tejido mamario de conejo.

Tabla 4: Permanencia a las 24 horas de la WTavidina y la OXavidina<sub>HABA</sub> en el tejido mamario de conejo.

% de ID/mama (+/- DE) a las 24 h	
WTavidina	OXavidina <sub>HABA</sub>
8,5 (1,13)	65,8 (0,08)

Ejemplo 5: Permanencia en el tejido de las avidinas de tipo salvaje, pegilada u oxidada

- 10 Las avidinas modificadas químicamente se describieron anteriormente por otros grupos con la intención de mejorar la vida media de la avidina en la circulación (Caliceti P., *et al.*, *J. Control. Release*, **2002**, 83, 97; Salmaso S., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **2007**, 340, 20). La permanencia en el tejido de la WTavidina, PEGavidina preparada según Caliceti, u OXavidina<sub>HABA</sub> (avidina oxidada según la presente invención) se evaluó en ratones C57Bl/6 (Charles River, Lecco Italia). Los animales se inyectaron (i.m.) en una pata trasera con 45 µg en 15 µl de WTavidina, PEG-avidina u OXavidina<sub>HABA</sub> marcadas con <sup>125</sup>I formuladas en tampón acetato 100 mM pH 5,5. Después de 24 horas desde la inyección, los animales se sacrificaron y la radioactividad en la pata tratada se midió por contador gamma (Cammerra Packard, Schwadorf Austria).

La conjugación PEG no afectó a la permanencia en el tejido de la WTavidina mientras que un aumento en la permanencia en el tejido se confirmó para la OXavidina<sub>HABA</sub> (Figura 5).

- 20 Ejemplo 6: Localización en el tejido de la WTavidina o la OXavidina<sub>HABA</sub>

La OXavidina<sub>HABA</sub> se evaluó para la localización en el tejido en comparación con la WTavidina en criosecciones de tejidos avidinados después de la inyección intramuscular en una pata trasera de ratones desnudos Balb/c (Harlan, Udine Italia). Los músculos se escindieron 24 h después del tratamiento y se prepararon criosecciones en serie de cada muestra. Cada loncha se tiñó con hematoxilina/eosina para evaluar la morfología del tejido o se incubó con un anticuerpo anti avidina de ratón (A5680, Sigma Aldrich, Italia) seguido por Alexa fluor 488 anti ratón (Invitrogen, Milán Italia). Finalmente, las lonchas se montaron con láminas cubreobjetos y se observaron bajo el microscopio.

- 30 Como se muestra en la Figura 6, las secciones obtenidas de los músculos inyectados con WTavidina (panel a) muestran una localización punteada débil mientras que las secciones de los músculos inyectados con OXavidina<sub>HABA</sub> (panel b) muestran una distribución homogénea fuerte. En ambos casos la avidina se localizó en el intersticio. La tinción de hematoxilina/eosina no mostró anomalías histológicas del músculo después de 24 h desde la inyección tanto con WTavidina como con OXavidina<sub>HABA</sub> (datos no mostrados).

Ejemplo 7: Captación sencilla y repetida de <sup>111</sup>In-ST2210

La OXavidina<sub>HABA</sub> se evaluó por su capacidad para capturar <sup>111</sup>In-ST2210 en un modelo de ratón que simula IART<sup>®</sup> en comparación con la WTavidina.

- 35 Los ratones Balb/c nu/nu (Harlan Udine, Italia) se inyectaron (i.m.) en una pata trasera con 45 µg en 15 µl tanto de WTavidina como de OXavidina<sub>HABA</sub> formuladas en tampón acetato 100 mM pH 5,5. Después de 48 horas desde la inyección, los animales recibieron de forma intravenosa (i.v.) 5 µg de <sup>111</sup>In-ST2210.

40 Los grupos de 5 animales se sacrificaron en los puntos temporales indicados y la radioactividad en la pata tratada además de en otros órganos que no son diana se midió por el contador gamma (Cammerra Packard, Schwadorf Austria).

- 45 Como se muestra en la Figura 7a la captación específica de <sup>111</sup>In-ST2210 después de 2 horas desde la inyección i.v. es mucho mayor para el tejido tratado con OXavidina<sub>HABA</sub> que para el tratado con WTavidina. Estas diferencias en la permanencia de radioactividad persisten en los puntos temporales posteriores hasta 24 horas desde la administración i.v. de <sup>111</sup>In-ST2210, confirmando así la avidinación del tejido de larga duración obtenida con OXavidina<sub>HABA</sub>. La distribución de <sup>111</sup>In-ST2210 en órganos que no son objetivo es similar para la WTavidina y la OXavidina<sub>HABA</sub> (Figura 7 b, c, d).

Un grupo de animales recibió una primera dosis intravenosa de 5 µg de ST2210 frío 24 horas antes de una segunda de 5 µg de <sup>111</sup>In-ST2210. La primera se dio 24 horas después de la avidinación. Los animales se sacrificaron 2 horas

después de la inyección i.v. de ST2210 radiomarcado y la radioactividad en la pata tratada se midió mediante el contador gamma como anteriormente.

5 Como se muestra en la Figura 7e la segunda dosis de <sup>111</sup>In-ST2210 se capturó por la pata tratada con OXavidina<sub>HABA</sub> a un nivel comparable con la obtenida con la dosis sencilla. Este resultado sugiere que el tejido avidinado no estaba saturado por la dosis sencilla de ST2210 usada en este estudio y que el fraccionamiento de una dosis prevista dada es viable.

Ejemplo 8: Captación de <sup>111</sup>In/<sup>90</sup>Y-ST2210 y eficacia terapéutica en ratones transgénicos NeuT

10 Los ratones transgénicos Balb/c que portan el oncogén HER-2/neu de rata activado (ratones Balb-NeuT (Di Carlo E., *et al.*, *Lab. Invest.*, **1999**, 79, 10, 1261) se proporcionaron amablemente por el Prof. Guido Forni, Universidad de Turín, Italia. Cuatro animales/grupo se inyectaron dentro del pezón en ambas mamas IV<sup>o</sup> con 25 µl (3,3 mg/ml) o bien de vehículo, WTavidina u OXavidina<sub>HABA</sub> en la semana 12 de vida que corresponde al periodo en que los animales desarrollan carcinoma in situ en todas las 10 mamas. Después de 48 horas los animales recibieron una dosis (i.v.) de 4,4 µg de ST2210 radiomarcado. Esta dosis corresponde a 800 µCi de <sup>90</sup>Y para propósitos terapéuticos con una punta de 40 µCi de <sup>111</sup>In-ST2210 para propósitos dosimétricos. Dos animales/grupo se sacrificaron 3 horas después de la administración y ambas mamas IV y III se escindieron y se contaron en un contador gamma como anteriormente. También se recogieron órganos que no eran objetivos, se pesaron y se contaron. Los datos se expresan como el % de ID/g de tejido. El efecto de esta braquiterapia pre-dirigida en las lesiones tumorales se evaluó mediante análisis de preparación completa de la glándula mamaria como se describe anteriormente (De Giovanni C., *et al.*, *Cancer Research*, **2004**, 64, 4001).

20 Los datos mostrados en la Tabla 5 indican que la captación específica de ST2210 radiomarcado es evidente en las mamas IV tratadas con OXavidina<sub>HABA</sub> pero ni en la mama IV de WTavidina ni en las mamas tratadas con vehículo de los ratones NeuT. Las mamas III de todos los grupos de animales son negativas (nivel de fondo en sangre) que indica que la avidinación está confinada a las mamas tratadas. Los datos del total están de acuerdo con la diferencia en la permanencia en el tejido descrita anteriormente para la WTavidina y la OXavidina<sub>HABA</sub>. La radioactividad de fondo en sangre y los órganos que no son objetivo que incluyen riñón, hígado y bazo estaba por debajo de 0,2% de ID/g de tejido en cualquier caso indicando que no hay necesidad de realizar una etapa de seguimiento con albúmina biotinilada como se necesita en la actual versión de IART<sup>®</sup>. El efecto de la actual braquiterapia basada en OXavidina<sub>HABA</sub> en la glándula mamaria de los ratones NeuT dio por resultado una reducción significativa de las lesiones cancerígenas en las mamas tratadas con OXavidina<sub>HABA</sub> en comparación con las mamas tratadas con vehículo o WTavidina (datos no mostrados).

Tabla 5

	Modelo NeuT % de ID de <sup>111</sup> In/ <sup>90</sup> Y-ST2210/g (± DE)					
	Sangre	Bazo	Riñón	Hígado	Mama IV	Mama III
Vehículo	0,003 (0,001)	0,007 (0,002)	0,143 (0,018)	0,023 (0,001)	0,007 (0,002)	0,005 (0,001)
WTavidina	0,002 (0,001)	0,008 (0,001)	0,161 (0,035)	0,027 (0,006)	0,028 (0,027)	0,007 (0,002)
OXavidina <sub>HABA</sub>	0,003 (0,001)	0,006 (0,001)	0,101 (0,008)	0,019 (0,003)	1,784 (0,512)	0,008 (0,001)

Ejemplo 9: Braquiterapia de una etapa

35 La <sup>125</sup>I-OXavidina<sub>HABA</sub> se saturó in vitro con ST2210, se purificó de ST2210 no unido por ultrafiltración y se inyectó de forma intramuscular en una pata trasera de ratones Balb/c. El mismo protocolo se siguió con respecto a la WTavidina.

La cantidad de WTavidina u OXavidina<sub>HABA</sub> saturada con ST2210 en la pata tratada, se comparó con la WTavidina u OXavidina<sub>HABA</sub> libre después de 1 semana.

40 Los resultado en la figura 8 indican que mientras la OXavidina<sub>HABA</sub> o bien complejada o no con ST2210 estaba aún presente una semana después de la inyección (17% de ID/100 mg), la WTavidina había desaparecido casi completamente (<0,5% de ID/100 mg) proporcionando así evidencia de que la OXavidina<sub>HABA</sub> pre-saturada con un agente biotinilado se comporta igual que la OXavidina<sub>HABA</sub> libre y podría usarse para la braquiterapia en una etapa.

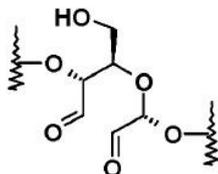
Ejemplo 10: Permanencia en el cerebro de OXavidina<sub>HABA</sub> en comparación con WTavidina

45 La <sup>125</sup>I-WTavidina u OXavidina<sub>HABA</sub>, preparadas como se describe anteriormente, se inyectaron en un volumen de 5 µl (dosis de 16 µl) en el cerebro de ratones Balb/c bajo anestesia general. La inyección en el cerebro se realizó a través del lado izquierdo del cráneo, usando una jeringa de Hamilton, a una profundidad de 4-5 mm. Los resultados en la figura 9 indican que de forma similar al músculo y la mama, la residencia de la OXavidina<sub>HABA</sub> en el cerebro,

después de 24 horas desde la inyección, es aproximadamente  $12,65 \pm 6,59\%$  de ID/100 mg de tejido. La cantidad de WTavidina como en otros tejidos previamente evaluados, es menor que  $2,08 \pm 1,03\%$  de ID/100 mg de tejido. Este resultado indica que la OXavidina<sub>HABA</sub> podría ser útil para la braquiterapia de tumores cerebrales o para la dirección al cerebro de compuestos terapéuticos biotinilados.

## REIVINDICACIONES

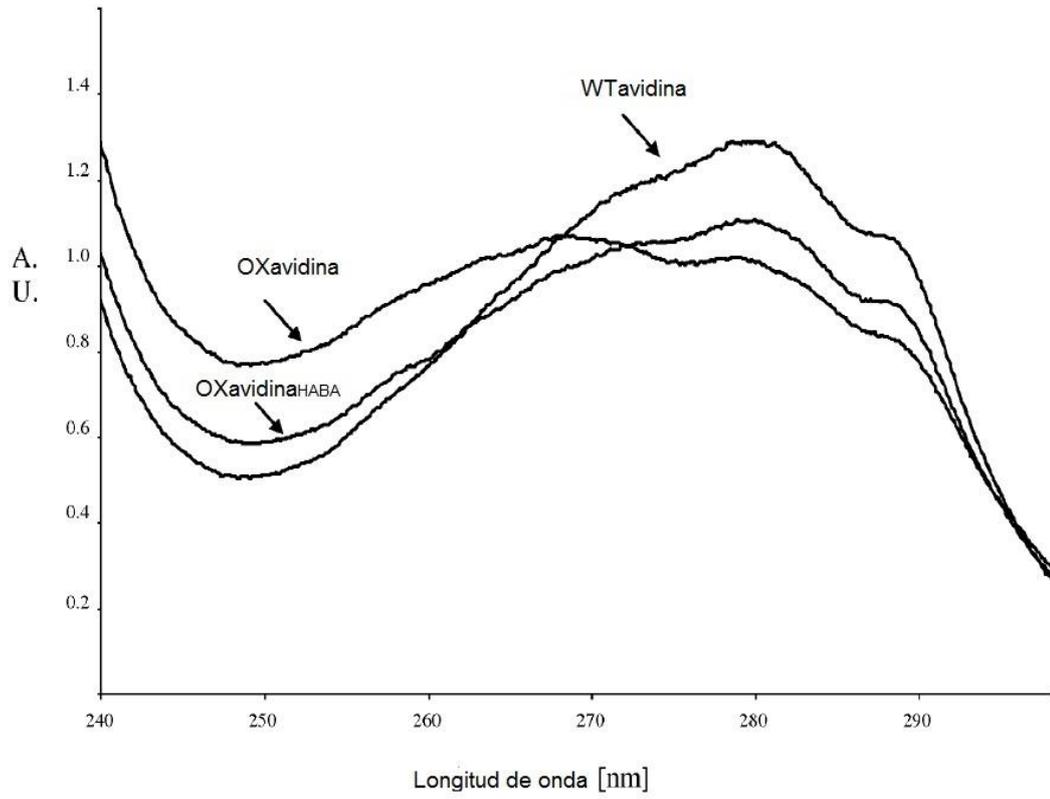
1. Una avidina oxidada en que al menos un residuo de manosa por molécula de avidina se sustituye por un residuo de la siguiente fórmula



- 5 En donde dicha avidina oxidada contiene aproximadamente de 8 a 15 restos aldehído y tiene una estabilidad térmica igual o mayor que 78°C.
2. Un complejo que consiste en una avidina oxidada según la reivindicación 1 y un agente terapéutico biotinilado.
3. Un complejo según la reivindicación 2, en donde el agente terapéutico biotinilado es un agente anticancerígeno.
4. El complejo según las reivindicaciones 2 o 3 para usar como un medicamento.
- 10 5. La avidina oxidada según la reivindicación 1 para usar en un tratamiento terapéutico en donde la avidina oxidada se administra a un paciente en una primera etapa del tratamiento, seguido por la administración de un agente terapéutico biotinilado.
6. El complejo según la reivindicación 3 o la avidina oxidada según la reivindicación 5 para usar en braquiterapia para tratar a un paciente afectado por una enfermedad cancerígena.
- 15 7. El complejo o la avidina oxidada según la reivindicación 6, en donde la enfermedad cancerígena es un cáncer de las mamas, páncreas, pulmón, pleura, peritoneo, cara y cuello, vejiga, cerebro, próstata, ovarios u ojos.
8. El complejo o la avidina oxidada según la reivindicación 7 en donde el agente terapéutico biotinilado se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, toxinas y células anticancerígenas.
- 20 9. El complejo según la reivindicación 4 o la avidina oxidada según la reivindicación 5 en donde el agente terapéutico está representado por células madre o células somáticas biotiniladas para el tratamiento de cáncer, enfermedades degenerativas o genéticas.
10. La avidina oxidada según la reivindicación 1 o el complejo según la reivindicación 4, para aplicaciones en la regeneración tisular útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunes/degenerativas/genéticas que incluyen, diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, Alzheimer, lesión vertebral, distrofia muscular de Duchenne, infarto de miocardio e ictus.
- 25 11. El complejo o la avidina oxidada según la reivindicación 8 en que dicho radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-125, I-131, P-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, I-131, Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Pb-212, Bi-212 y Lu-177.
- 30 12. Una composición farmacéutica que comprende una avidina oxidada o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Un kit que comprende una composición farmacéutica según la reivindicación 12 que contiene una avidina oxidada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un recipiente y un agente terapéutico biotinilado en un segundo recipiente.
- 35 14. Un kit según la reivindicación 13 para una terapia locoregional y/o sistémica intra y perioperativa adyuvante en dos etapas, en donde los dos recipientes tienen la forma de una jeringa.
15. Un procedimiento de oxidación de avidina en donde la oxidación comprende las siguientes etapas:
- a) incubado de avidina de tipo salvaje premezclada con un exceso molar de (HABA), con peryodato sódico 10-20 mM en tampón acetato 50-100 mM a pH por debajo de 6,0 durante 1-5 horas a 4°C o a temperatura ambiente;
- 40 b) bloqueo de la reacción y purificación por eliminación del agente oxidante y HABA por cromatografía, ultrafiltración o diálisis; y
- c) liofilizado o formulación a un pH ácido.
16. Una avidina oxidada obtenible mediante el procedimiento según la reivindicación 15.

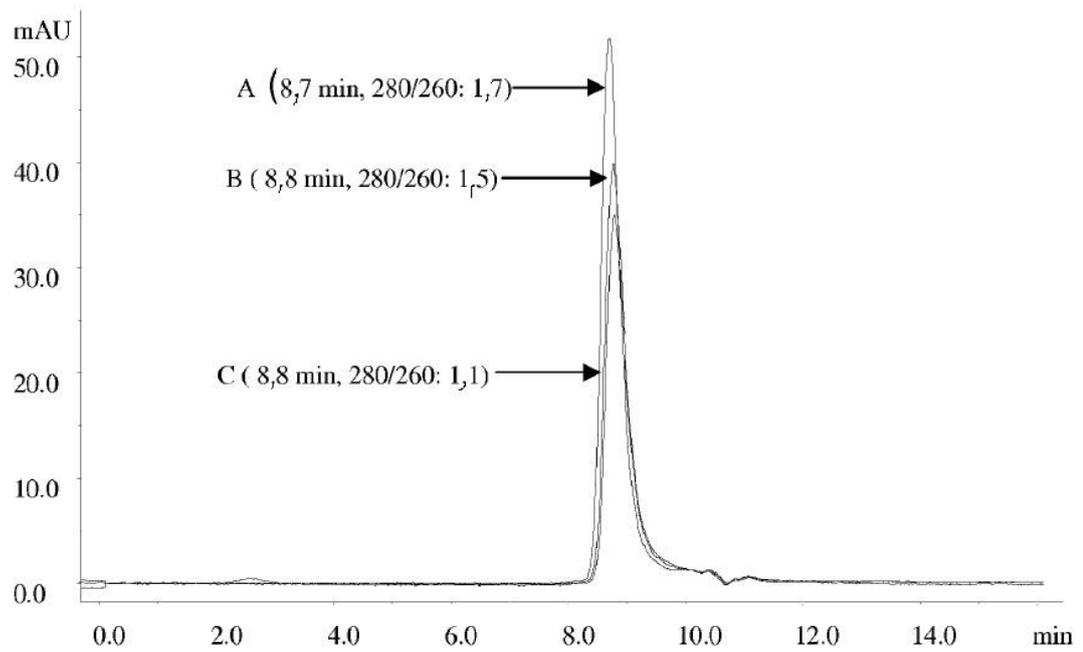
**Figura 1**

Espectros UV de absorbancia de WTavidina , OXavidina OXavidina<sub>HABA</sub>



**Figura 2**

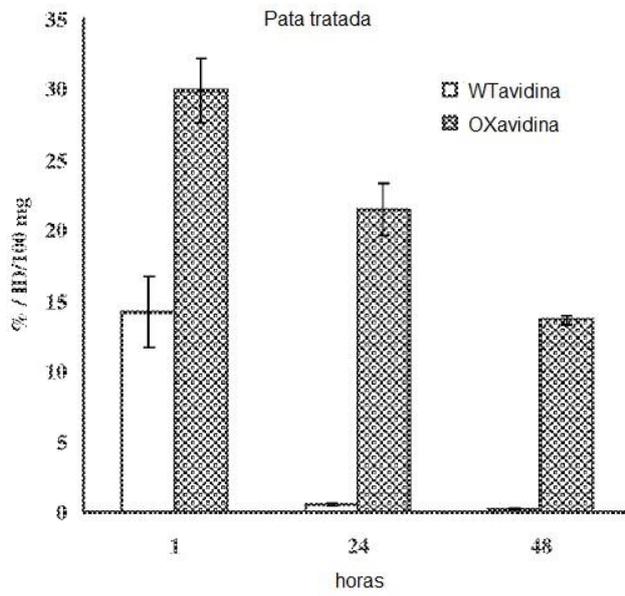
Análisis SEC HPLC de OXavidina<sup>HABA</sup> en comparación con OXavidina y WTavidina



**Figura 3**

Permanencia en el tejido de <sup>125</sup>I-avidinas después de inyección i.m.

**Figura 3a**



**Figura 3b**

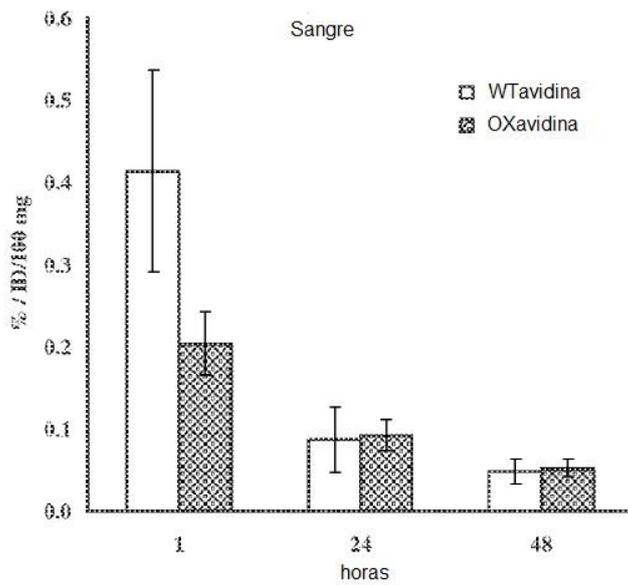


Figura 3c

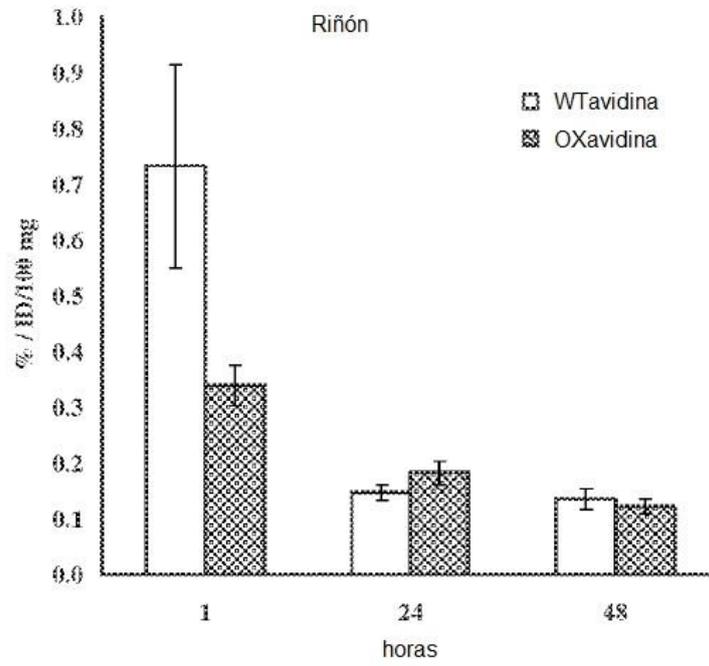


Figura 3d

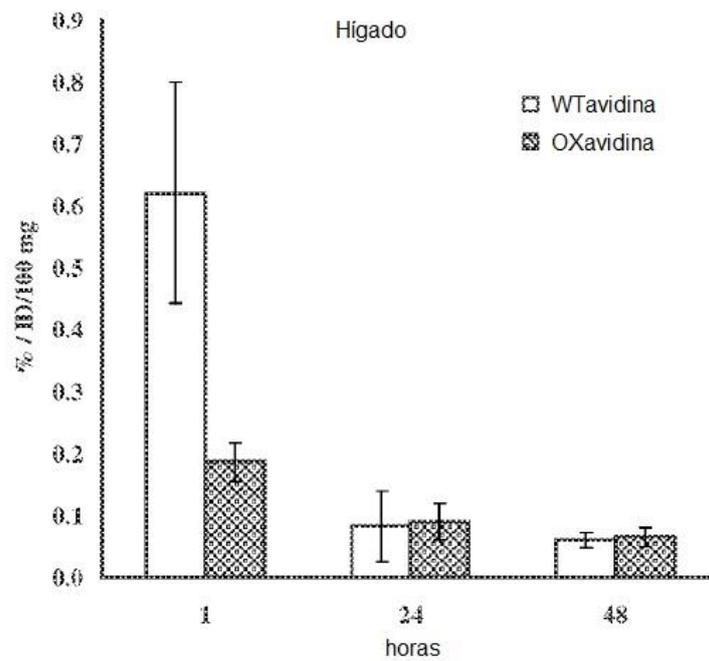
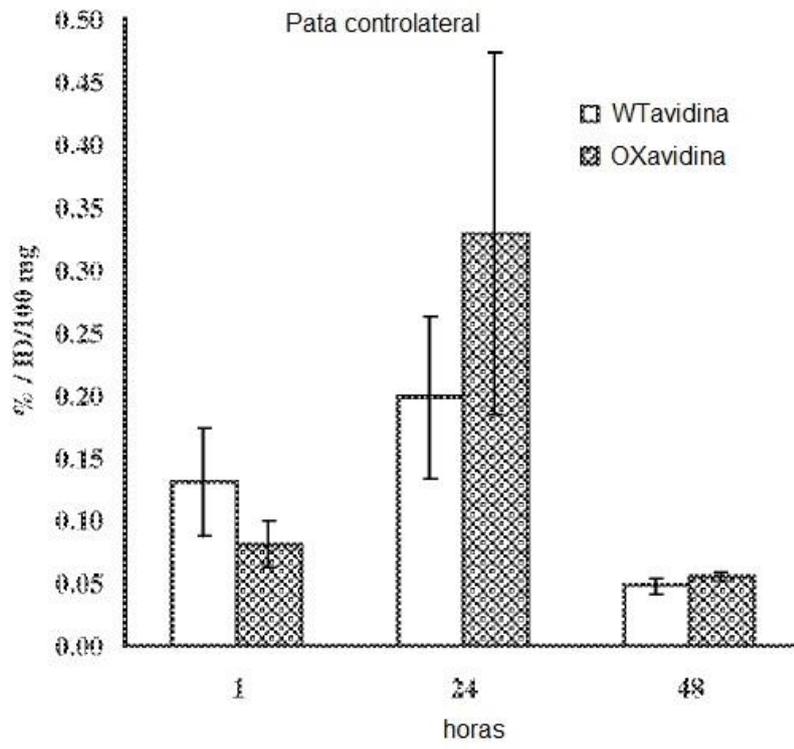
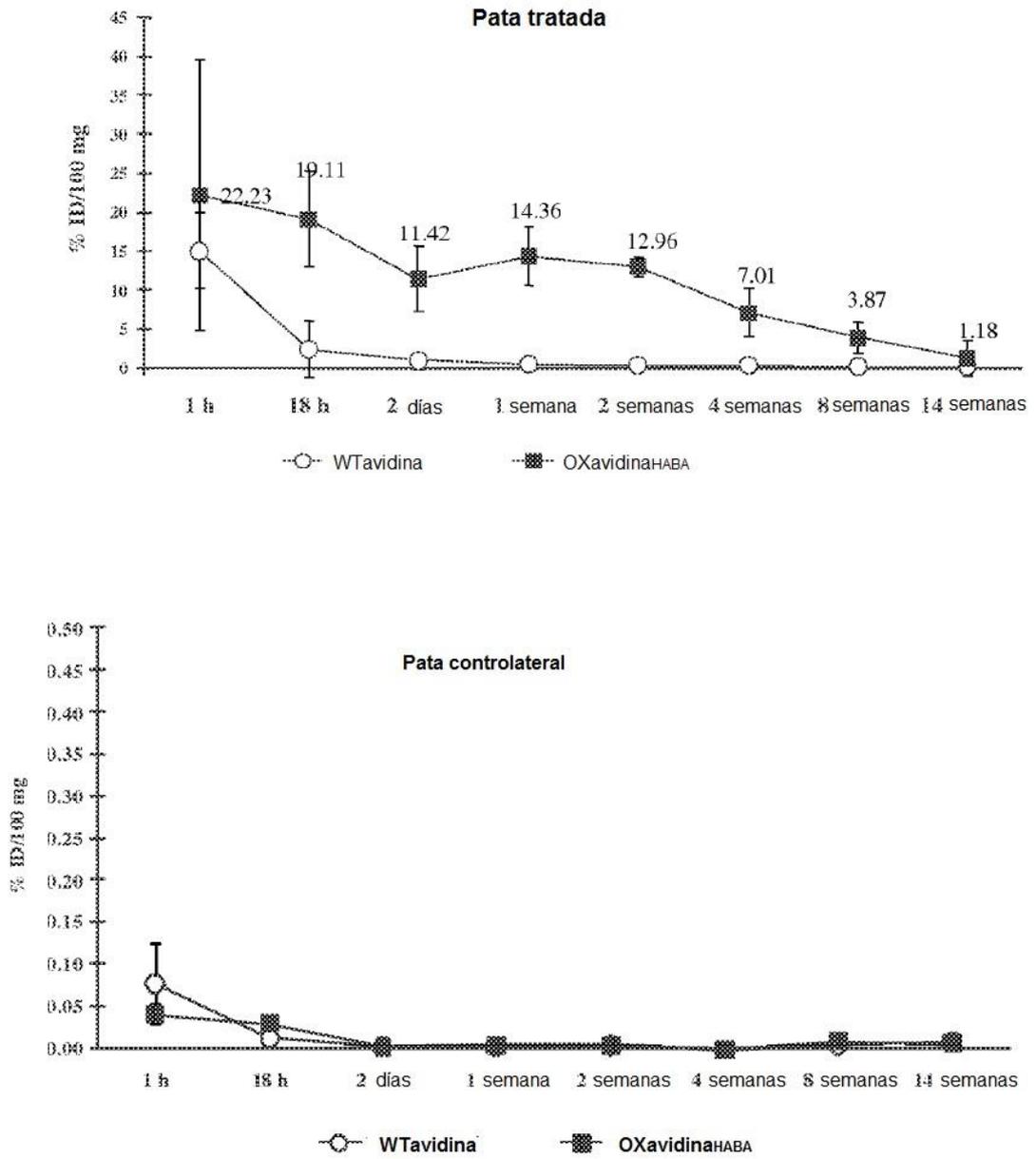


Figura 3e



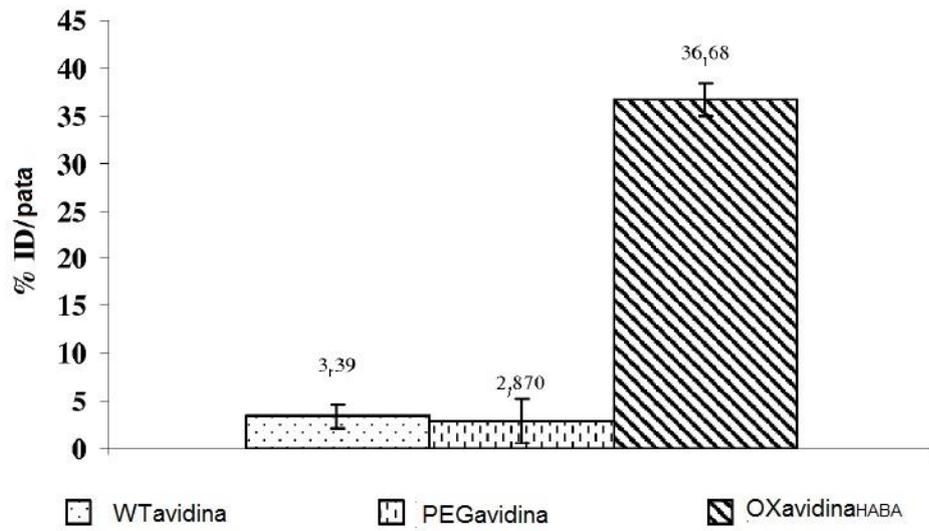
**Figura 4**

Permanencia a largo plazo de la OXavidina<sub>HABA</sub> en comparación con WTavidina en un tejido tratado



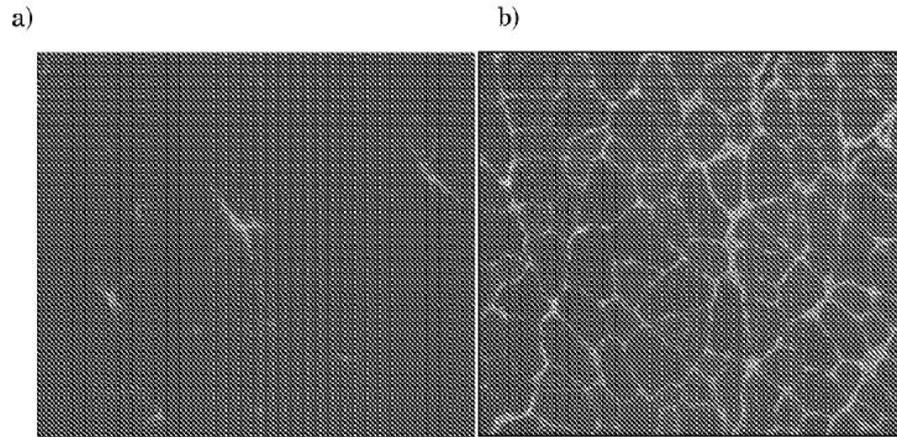
**Figura 5**

Permanencia en el tejido de OXavidina<sub>HABA</sub> en comparación con WTavidina y PEGavidina



**Figura 6**

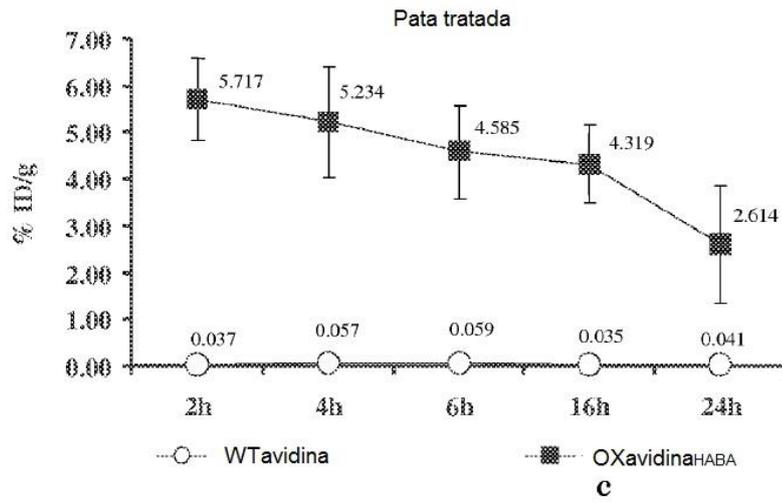
Inmunofluorescencia de WTavidina u OXavidina<sup>HABA</sup> en el tejido tratado 24 h después de la inyección



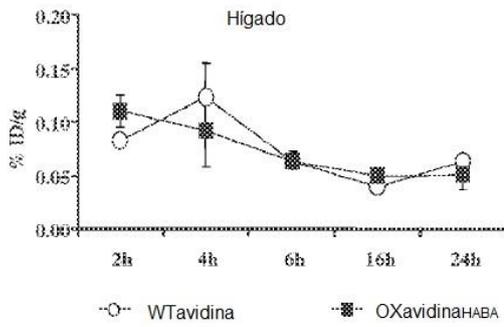
**Figura 7**

Permanencia en el tejido de  $^{111}\text{InST2210}$  inyectado i.v. 48 horas después de la avidinación del tejido

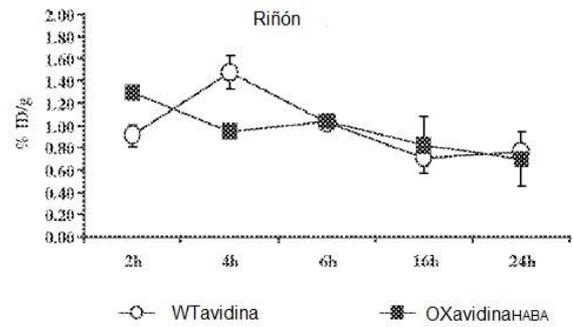
**a**



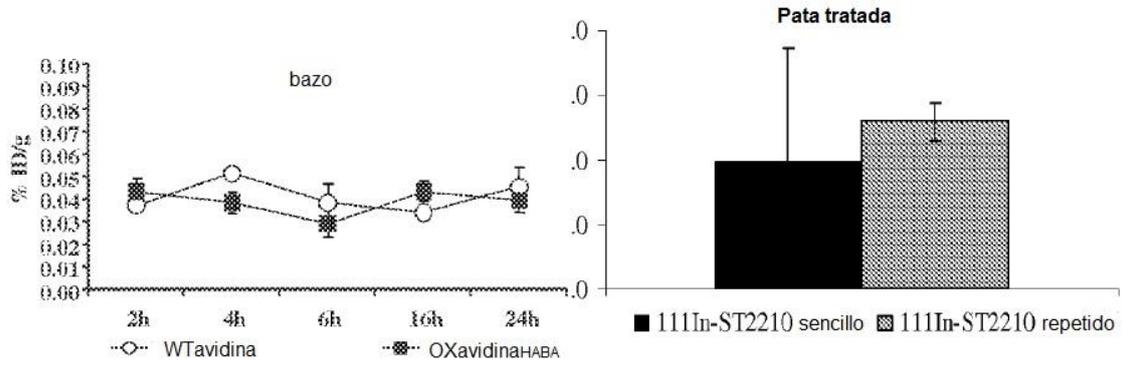
**b**



**d**

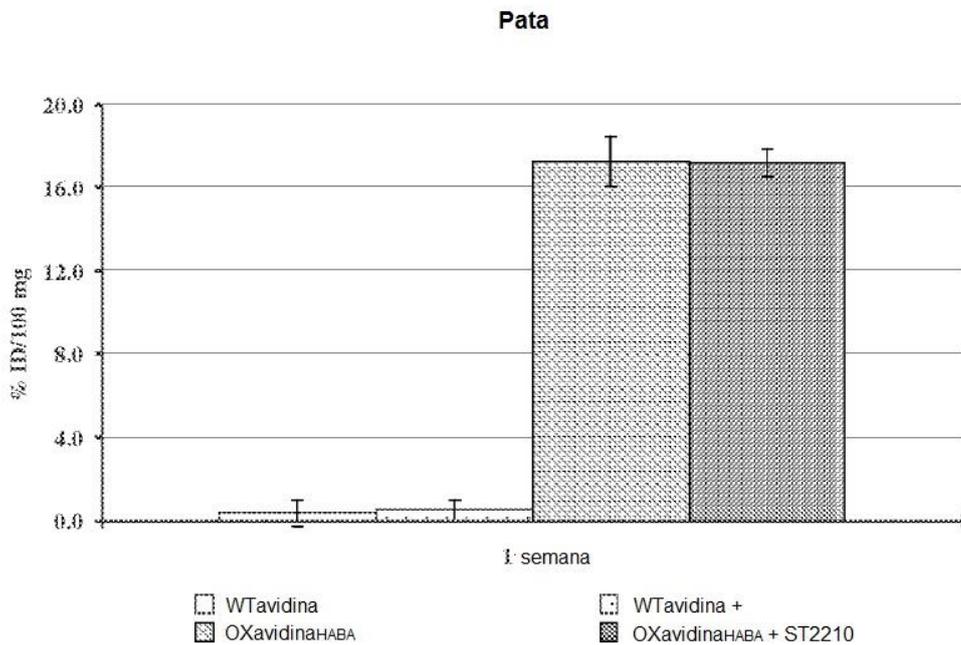


**e**



**Figura 8**

Permanencia en el tejido del complejo OXavidina<sub>HABA</sub>/ST2210 en comparación con WTavidina/ST2210



**Figura 9**

Permanencia en el cerebro de OXavidina<sup>HABA</sup> en comparación con WTavidina

