



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 427 140**

⑮ Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2002 E 02779459 (3)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 1435914**

④ Título: **Preparación farmacéutica liofilizada galénica, estable, de polipéptidos recombinantes que fijan los carbohidratos**

⑩ Prioridad:

05.10.2001 DE 10149030

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2013

⑬ Titular/es:

**VISCUM AG (100.0%)
TECHNOLOGIEPARK HAUS 8 FRIEDRICH-
EBERT-STRASSE
51429 BERGISCH-GLADBACH, DE**

⑭ Inventor/es:

**GLOGER, OLIVIER;
MÜLLER, BERND W. y
WITTHOHN, KLAUS**

⑮ Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 427 140 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

Preparación farmacéutica liofilizada galénica, estable, de polipéptidos recombinantes que fijan los carbohidratos

5 La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un medicamento que contiene un polipéptido que comprende, como mínimo, un polipéptido recombinante que fija carbohidratos o un fragmento funcional o un derivado de dicho polipéptido que fija carbohidratos en forma estable de almacenamiento. El mencionado polipéptido comprende polipéptidos o derivados funcionales de los mismos, los cuales están fusionados por péptidos con función citotóxica formando proteínas de fusión, o que están unidos con otro polipéptido, el cual presenta actividad 10 citotóxica. Además, la invención se refiere a la formulación del medicamento que se da a conocer, para diferentes formas de administración del medicamento.

15 La investigación médica ha puesto de manifiesto en los últimos años un amplio espectro de enfermedades que pueden ser tratadas con proteínas recombinantes. Son ejemplos de proteínas de origen humano la insulina, EPO y G-CSF cuyas formas de administración y tipos de aplicación han sido descritas en diferentes patentes europeas. El documento EP 0 430 200 B1 describe la utilización de proteínas humanas para utilización subcutánea e intramuscular. Se conocen medicamentos con proteínas humanas estabilizadas que contienen, entre otros, urea o distintos aminoácidos, por el documento EP 0 306 824 B1. En dicha patente, se explican como ejemplos EPO y G-CSF. El documento EP 0 607 156 B1 describe la fabricación de medicamentos conservados con proteínas humanas 20 con objetivos de infusión o de inyección.

25 De modo general, el concepto "recombinante" se refiere a proteínas que son fabricadas con ayuda de tecnología de ADN recombinante. Estos procedimientos comprenden el clonado de genes que codifica para la proteína correspondiente, la inserción del correspondiente cADN o ADN genómico en un sistema detector apropiado y la transformación/transfección de estos vectores en organismos huésped apropiados (bacterias o células eucariotas). Si el gen clonado se expresa en el organismo huésped, la correspondiente proteína puede ser conseguida a partir de un cultivo (cuando la proteína secretada) se obtiene o de un homogeneizado del organismo huésped (cuando la correspondiente proteína es expresada de forma intracelular). Se han descrito procedimientos para la fabricación de proteínas recombinantes, tanto para animales como para plantas. Un ejemplo del procedimiento preciso para la 30 fabricación de una proteína de un dímero de plantas se describe en el documento EP 0 751 221 B1. Esta patente describe entre otros, el primer clonado satisfactorio del gen que codifica las subunidades ML. Además, se describen en esta patente, igualmente, la utilización de estas proteínas dímeras de plantas, fabricadas de forma recombinante, para la fabricación de medicamentos.

35 La utilización de extractos de muérdago (extractos de *Viscum album*) como medio curativo, se conocen desde hace siglos. Como componente efectivo de estos extractos, se identificaron sustancias contenidas designadas como lectina. En estas lectinas son sustancias de albúmina que reconocen estructuras de carbohidratos muy específicas, incluso en formas unidas a lípidos o a proteínas y que se unen a éstas. La lectina de muérdago que fue identificada como proteína inactivadora de ribosomas de clase II, actúa farmacológicamente solo a través de la colaboración de sus dos subunidades. La cadena B de la lectina de muérdago, que presenta motivos de secuencia con propiedades 40 específicas de unión a carbohidratos, es responsable en este caso del transporte de la proteína a la célula diana. En las células diana se bloquea entonces la subunidad A mediante su actividad enzimática rARN-N-glicosidasa, el intercambio de sustancias ribosomales de las células y provocan de esta manera, una muerte celular programada (apoptosis) de éstas.

45 Los preparados farmacéuticos conocidos hasta el momento en el estado de la técnica, contienen de modo general proteínas humanas, proteínas humanizadas, proteínas de plantas que contienen extractos o proteínas aisladas de plantas. Es decisivo para la efectividad de los preparados que contienen proteínas, el mantenimiento de la actividad biológica de estas proteínas. Para rViscumin es, por ejemplo, la estructura dímera y el mantenimiento de las 50 actividades asociadas a las cadenas individuales y la forma de la efectividad farmacológica de estas moléculas. El mantenimiento de estas actividades biológicas es fuertemente dependiente de valor del pH de la solución que contiene la proteína (ver figura 1). Además, las condiciones de almacenamiento de las correspondientes preparaciones influyen en la estabilidad de un principio medicamentoso/medicamento.

55 En la patente europea EP 0 602 686 B1 se describió la forma de actuación de la planta de muérdago y los extractos conseguidos a base de la misma para el tratamiento de enfermedades. Los extractos de muérdago se han utilizado terapéuticamente durante siglos, tal como se indica en dicha descripción. Desde el principio de este siglo, se han utilizado preparados de muérdago para terapia de cáncer con diferentes resultados (Bocci, 1993; Gabius y otros, 1994; Gabius & Gabius, 1994; Ganguly & Das, 1994). Hajto y otros (1989, 1990) pudieron demostrar que los efectos 60 terapéuticos podrían ser proporcionados, en especial, mediante la llamada lectina de muérdago (*Viscumina*, Aglutinina de *Viscum album*, VAA). Se discute en la actualidad, aparte de un efecto citotóxico, en especial, una inmunoestimulación (no específica), cuyos efectos positivos han sido utilizados para terapia acompañante y para cuidados posteriores de pacientes afectados de tumores. El aumento de la calidad de vida en dichos pacientes se habrá conseguido posiblemente por la generación de endorfinas del propio cuerpo (Heiny y Beuth, 1994).

65 Numerosas investigaciones in vitro (Hajto y otros, 1990; Männel y otros, 1991; Beuth y otros, 1993a) e in vivo (Hajto,

1986; Hajto y otros, 1989, Beuth y otros, 1991; Beuth y otros, 1992), así como estudios clínicos (Beuth y otros, 1992) justifican la liberación más elevada provocada por lectina de muérdago de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6) así como una activación de componentes celulares del sistema inmune (células TH, células NK).

5 Como principio activo del extracto de muérdago, se considera en la actualidad una proteína de lectina de muérdago de 60kDa que puede ser conseguida por vía bioquímica a base de extractos (Franz y otros, 1977; Gabius y otros, 1992). La proteína ML se compone de dos subunidades covalentes unidas en puente S-S, cuyas cadenas A son responsables de la inactivación enzimática de ribosomas (Endo y otros, 1998) y sus cadenas B para la unión de carbohidratos. La actividad biológica se correlaciona con el mantenimiento de la actividad de la lectina de la cadena B (Hajto y otros, 1990).

10 La utilización de una forma medicamentosa o bien de un preparado de medicamento con rViscumin como componente activo, presenta una interesante y ventajosa alternativa a la preparación de plantas, puesto que se tiene ahora la posibilidad de utilizar una sustancia clasificada químicamente como medicamento. Precisamente, teniendo en cuenta la elevada toxicidad de la lectina de muérdago, resulta posible una buena tolerancia mediante una dosificación precisa mediante la utilización de proteínas fabricadas de forma recombinante. En este caso, es especialmente ventajosa una forma medicamentosa o una preparación de medicamento que es estable en almacenamiento a lo largo de un prolongado periodo de tiempo, es decir, varios meses, y preferentemente, como mínimo, un año. El almacenamiento de la forma medicamentosa, o bien del preparado de medicamento en esta forma estable al almacenamiento, debe ser posible además de manera simple y sin gran complicación técnica. Además, la forma medicamentosa o bien preparación de medicamento, cuando su forma estable en almacenamiento no corresponde a la forma de administración, puede ser formulable adicionalmente de manera sencilla a una forma de administración correspondiente. Con fórmulas acuosas, según el estado de la técnica, se pueden conseguir tiempos de almacenamiento de menos de 10 semanas (2,5 meses) en condiciones de almacenamiento de 2-8°C (nunca).

15 El problema que subyace técnicamente en la presente invención era, por lo tanto, la preparación de un procedimiento para la fabricación de un medio medicamentoso o una preparación de medicamento en una forma estable de almacenamiento durante largo tiempo que posibilite una manipulación simple, tanto en el almacenamiento como también en la administración y opcionalmente, en la preparación. El medicamento de la invención debe comprender, como mínimo, un polipéptido fijador de carbohidratos, recombinante, o un fragmento funcional o derivado de este polipéptido, conteniendo además, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.

20 Ese problema técnico es solucionado mediante las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

25 Como consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un medicamento que contiene un polipéptido, que comprende, como mínimo, un polipéptido de fijación de carbohidratos, recombinante, de una cadena B de una proteína inactivadora de ribosomas o fragmento funcional o derivado de este polipéptido, de forma que permite el almacenamiento estable durante largo tiempo, conteniendo además opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, comprendiendo las etapas de refrigeración, congelación, secado por pulverización o liofilización, manteniendo las propiedades farmacológicas del polipéptido en la solución, de manera que la solución se caracteriza porque el valor del pH de la solución es mayor de 6,0 y un sistema tampón contenido en un medio de solución garantiza el mantenimiento de este valor de pH.

30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999

- polipéptido y de la eficacia asociada a aquél en este medicamento o del preparado. Preferentemente, es en este concepto una forma estable en almacenamiento de un medicamento o preparado medicamentoso, según la invención, aquél que se almacena durante un periodo de tiempo de 1,2,3,4 ó 5 años, preferentemente, según condiciones de almacenamiento habituales del mercado y que se mantienen por los distribuidores y usuarios (2-8°C y/o temperatura ambiente por debajo de 25°C) sin que se produzca una significante variación de las propiedades específicas del preparado medicamentoso y del polipéptido y de la eficacia del medicamento asociada a aquéllos o del preparado del medicamento. Por esta razón, se refiere la invención a formas de almacenamiento y transporte fácilmente manipulables de los polipéptidos descritos en esta invención.
- 5 La formulación de medicamento, según la invención, tiene lugar opcionalmente en combinación con un "portador farmacológicamente aceptable" y/o un medio de dilución. Son ejemplos de portadores farmacológicamente aceptables especialmente apropiados, los conocidos por los expertos que comprenden soluciones tamponadas de sal, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de detergentes, soluciones estériles, etc. Los medicamentos que comprenden este tipo de portadores pueden ser formulados mediante métodos convencionales conocidos. Estos medicamentos pueden ser administrados a un individuo mediante una dosis apropiada. La administración puede tener lugar por vía oral o parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, local, intranasal, intrabronquial o intradérmica, o bien mediante un catéter en un lugar de una arteria. El tipo de la dosificación se determinará por el médico que efectúa el tratamiento, de acuerdo con factores clínicos. Es conocido por los expertos, que el tipo de dosificación depende de diferentes factores, por ejemplo, dimensiones corporales o bien peso, superficie del cuerpo, edad, sexo o, en general, de la salud del paciente y también por el medio especial a administrar, la duración y tipo de administración y de otros medicamentos que posiblemente son administrados de forma paralela. Una dosis típica se puede encontrar, por ejemplo, en un rango de 0,001 y 1000 µg, de manera que son previsibles dosis por debajo o por encima de este rango que tiene carácter de ejemplo, sobretodo teniendo en cuenta los factores explicados. De manera general, en la administración regular de la composición, según la invención, la dosis se debe encontrar en un rango comprendido entre 10 ng y 10 mg unidad por diez, o bien por intervalo de aplicación. Si el compuesto es administrado por vía intravenosa, la dosis debe encontrarse en un rango entre 1 ng y 0,1 mg unidad por quilo de peso corporal y por minuto.
- 10 El compuesto de la invención puede ser administrado localmente o de forma sistémica. Los preparados para una administración parenteral comprenden soluciones estériles, acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Son ejemplos para medios de solución no acuosos el propilenglicol, polietilenglicol, aceites de plantas, tales como aceite de oliva y compuestos de ésteres orgánicos, por ejemplo, oleato de etilo para las inyecciones. Los soportes acuosos comprenden agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones, suspensiones, soluciones de sales y medios tamponados. Los soportes parenterales comprenden soluciones de cloruro sódico, dextrosa anular, dextrosa y cloruro sódico, lactato anular y aceites combinados. Los soportes intravenosos comprenden, por ejemplo, medios líquidos, nutrientes y electrolitos como medios de ampliación, (tales como, por ejemplo, los que se basan en dextrosa anular ("Ringer"). La composición, según la invención, puede comprender además un medio conservante y otros aditivos, tales como, por ejemplo, compuestos antimicrobianos, antioxidantes, formadores de complejos y gases inertes. Además, se pueden contener, dependiendo de la utilización prevista, compuestos tales como interleucina, factores de crecimiento, factores de diferenciación, interferones, proteínas quimiotácticas o un agente inmunomodulador no específico.
- 15 Las sustancias tampón utilizadas son apropiadas durante la fase de enfriamiento, congelación, secado por pulverización o liofilización para mantener el valor del pH ajustado dentro del rango prescrito. Las sustancias tampón se escogerán preferentemente de forma tal que, para una capacidad reducida de tampón, no es posible la variación del valor del pH ajustado de la solución durante el proceso de congelación a valores demasiado reducidos. Durante el mantenimiento de un elevado valor de pH durante el proceso de liofilización, la estabilidad del polipéptido queda garantizada. Una reducida capacidad tampón es además preferente para una solución para inyecciones lista para aplicación. En el ejemplo 1, se describe un procedimiento para la comprobación del valor del pH durante la refrigeración o bien durante la congelación de preparados medicamentosos. Con ayuda de este u otros procedimientos similares, se pueden determinar sustancias tampón que son apropiadas para el procedimiento de la invención.
- 20 En el estado de la técnica se describen múltiples medicamentos que contienen soluciones tamponadas compuestas de bajo peso molecular, compuestos olegómeros (incluso péptidos) y compuestos de alto peso molecular (incluso polipéptidos). De modo correspondiente, para múltiples medicamentos de este tipo, que contienen las correspondientes composiciones, que son estables en un amplio rango de pH, se describen procedimientos para mejorar las características de almacenamiento que son conocidos por los técnicos. Son ejemplos de ello procedimientos que comprenden la congelación, secado por pulverización o liofilización del medicamento. En base a esta estabilidad independiente del valor de pH hasta el momento, no se había descrito como necesario ningún control específico del valor del pH durante el proceso de congelación o de secado por pulverización. Igualmente, se disponen en las instalaciones de liofilización habituales para la fabricación de medicamentos y preparados medicamentosos.
- 25 En la utilización de estos procedimientos conocidos, se comprobó de manera sorprendente que las propiedades de la lectina de rViscumin y otros polipéptidos dímeros de plantas de la clase II de las proteínas activadoras de
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- ribosomas (RIP II) son sensibles en circunstancias determinadas al valor del pH del medio de solución utilizado en este procedimiento. Las variaciones fuertes de este valor y, en especial, un medio fuertemente ácido puede tener como consecuencia una determinada pérdida de las propiedades específicas de la lectina. De manera correspondiente, el mantenimiento del rango de pH anteriormente determinado es una característica importante de la invención. Para el mantenimiento de estas propiedades específicas, es necesario un control del valor del pH de la solución en todas las etapas de preparación para garantizar la estabilidad del polipéptido. En el ejemplo 1, se ha descrito un procedimiento para la comprobación del valor del pH durante el enfriamiento, o bien congelación de preparados medicamentosos.
- 10 En una forma de realización preferente, el procedimiento descrito comprende un polipéptido, que contiene
- (a) el polipéptido fijador de carbohidratos recombinante o un fragmento funcional o derivado de dicho polipéptido, que está fusionado con un péptido con función citotóxica, formando una proteína de fusión;
- 15 (b) el polipéptido fijador de carbohidratos recombinante o un fragmento funcional o derivado de dicho polipéptido, el cual está unido a otro polipéptido que presenta una actividad enzimática rARN-glicosidasa;
- 20 (c) el polipéptido fijador de carbohidratos recombinante o un fragmento funcional o derivado de dicho polipéptido, el cual está unido a otro polipéptido, en el que una actividad enzimática rARN-glicosidasa ha sido sustituida por otra actividad citotóxica; o bien
- 25 (d) el polipéptido fijador de carbohidratos recombinante o un fragmento funcional o derivado de dicho polipéptido, el cual está unido a una proteína de fusión, que comprende un polipéptido con actividad enzimática rARN-glicosidasa y/u otra actividad citotóxica.
- 30 De modo correspondiente a esta forma de realización preferente de la invención, el polipéptido que fija carbohidratos recombinante o un fragmento funcional o derivado de dicho polipéptido está unido a otro péptido que presenta actividad citotóxica. Esta unión del péptido puede ser covalente, también una unión que concierne a otros efectos de intercambio físicoquímico. Los ejemplos para la unión covalente de los péptidos de la invención comprenden tanto uniones de péptidos que son característicos para proteínas de fusión como también uniones de disulfuro.
- 35 En el sentido de la invención, el polipéptido de fijación de carbohidratos o un fragmento funcional o derivado de dicho polipéptido posibilita una interacción de la proteína con la superficie celular de la célula diana. En combinación, el péptido actúa con actividad citotóxica o bien de forma directa sobre la superficie celular (por ejemplo, por formación de poros en la membrana celular) o bien después de la introducción en la célula (por ejemplo, por inhibición o destrucción de la biosíntesis proteínica por inducción de una cascada de señal de apoptosis o por inhibición de la destrucción de la actividad de las mitocondrias). La actividad citotóxica puede ser comprobada mediante diferentes pruebas conocidas por los expertos ("prueba JAM" ver Matzinger (1991), "⁵¹Cr-Freisetzungstest", "Propidiumlolid-Färbung von Zellen" o bien "Annexin-V Test" ver Dulat (2001)).
- 40 Son ejemplos para péptidos con actividad enzimática rARN-glicosidasa de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP), entre otros, los trabajos de Endo y otros (1988 y 1989) y un artículo de resumen de Peumans y otros (2001).
- 45 En otra forma preferente de realización del procedimiento, el polipéptido que fija carbohidratos, recombinante, es la cadena B de una proteína inactivadora de ribosomas.
- 50 En otra forma de realización preferente, el polipéptido adicional, que está unido con el polipéptido de fijación de carbohidratos, recombinante, es la cadena A de una proteína inactivadora de ribosomas.
- 55 En otra forma de realización adicional preferente, la cadena B y/o la cadena A de la proteína inactivadora de ribosomas corresponde a la cadena B o a la cadena A de una proteína inactivadora de ribosomas de tipo II. Esta proteína inactivadora de ribosomas de tipo II es preferentemente rViscumin. Tanto la función como la formación recombinante de la holoenzima rViscumin son descritas como ejemplo para una proteína inactivadora de ribosomas en el documento EP 0 751 221 B1.
- 60 En otra forma de realización preferente del procedimiento, se garantiza que el valor del pH de la solución se encuentra entre 6,0 y 9,0, siendo especialmente preferente un valor del pH de la solución comprendido entre 7,5 y 8,5. Tal como se ha mostrado en los ejemplos, un pH de 8,0 es especialmente preferente. Un rango menos preferente de pH de la solución es el rango por encima de pH 12, puesto que para estos elevados valores de pH se deben esperar desamidaciones y, por lo tanto, se modificarán las propiedades del polipéptido como sustancia medicamentosa. Sin excluir rangos de pH más elevados, se escogerá, por lo tanto, en el procedimiento de la invención, habitualmente un rango de pH mayor de 6,0 y menor de pH 12. No obstante, el técnico puede escoger claramente también un rango de pH por encima de pH 12. No obstante, es preferente que el valor del pH del medicamento antes de la administración a los pacientes sea ajustado a un rango de pH de valor fisiológico. Un procedimiento para el control del valor del pH durante la realización de procedimiento de la invención se describe en el ejemplo 1.

Es igualmente preferente un procedimiento en el que la sal o las sales del sistema tampón son utilizadas en una concentración final de 0,6% a 2,4% (5 mM a 200 mM). Adicionalmente preferente es un procedimiento en el que la sal o las sales del sistema tampón son utilizadas en una zona de concentración final de 100 mM a 200 mM. De manera correspondiente, es preferente, por ejemplo, una concentración final para tris-base de 100 a 200 nM (1,2% a 2,4%), puesto que en todos los estudios realizados a este respecto de la invención se han observado con formulaciones optimizadas una pérdida de rViscumin dependiente del proceso de 5% solamente. Para el rango de concentración final de 20 mM a 100 mM se detectó una correspondiente pérdida en un rango de 10 a 15 %, tal como muestran los ejemplos. Para una concentración por debajo de la concentración óptima de 20 mM se detectó una correspondiente pérdida en un rango 10 a 20%.

En relación con la presente invención, el concepto "concentración final" significa la concentración de la solución en masa/volumen (mN), que ajusta el técnico en los procesos de enfriamiento, congelación, liofilización o secado por pulverización.

Además, es preferente un procedimiento en el que la sal o las sales de sistema tampón se escogen del grupo que comprende: TRIS/HCl, TRICIN/HCl, HEPES/HCl, tampón de carbonato amónico, TRIS/ácido glutámico y TRIS/ácido asparagínico. Tal como se ha descrito, entre otros, en los ejemplos adjuntos, estos sistemas tampón garantizan para las combinaciones escogidas de sustancias de partida, un mantenimiento de un elevado valor del pH en las correspondientes soluciones durante la fase de congelación. Por esta razón, los sistemas tampón correspondientes facilitan una aportación decisiva para la estabilidad del polipéptido.

En otra forma de realización preferente del procedimiento de la invención, para la estabilización de las propiedades farmacológicas del polipéptido, la solución contiene una o varias sustancias con actividad superficial. Estas sustancias con actividad superficial actúan como medios reticulantes, disponen, por lo tanto, una solución debajo de la superficie y favorecen la reticulación de liofilizados con una solución de reconstitución. Además, estas sustancias presentan los llamados "hot spots" ("puntos calientes") en las paredes de las cubas de preparación utilizadas y medios de envasado primarios, en las que se puede fijar preferentemente rViscumin como proteína hidrófoba. En ausencia de medios reticulantes, son probables las pérdidas de proteína, por ejemplo, actividad de proteína durante los procesos de fabricación y de envasado y en las soluciones de medicamento. Además, la añadidura de medios de reticulación es ventajosa para evitar pérdidas después de la reconstitución del material en polvo liofilizado. Estas pérdidas tendrían como resultado una dosificación imprecisa.

Preferentemente, se utilizan, en este caso, tensoactivos no iónicos como sustancias con actividad superficial, de manera que éstas se utilizan en un rango de 0,01 a 5,0% de concentración final.

Los tensoactivos no iónicos preferentes son escogidos del grupo que comprende: alcoholes grasos, glicéridos parciales, Polysorbat, éter de ácido polioxietilénico, y éster de ácido graso polioxietilénico, poloxámero (Polímero bloque de polioxipropileno-polioxietileno), éster de ácido graso sacárido, éter de polioexietilensorbitol y éster de ácido graso de polioxietileno, éster de ácido polioxiglicerina y fosfátidos.

Son ejemplos preferentes para Polysorbats los que se escogen del grupo que comprende Polysorbat 80, Polysorbat 20.

Son además preferentes el éter del ácido graso polioxietilénico y el éster del mismo ácido, macrogol éter o macrogol éster, el poloxámero Pluronic F68, poloxámero 166 o 188 y los fosfátidos tales como lecitina. En esta relación, están comprendidos también derivados de lecitinas de soja o de clara de huevo.

Son igualmente preferentes como sustancias con actividad superficial, los tensoactivos anfóteros, que son utilizados con un rango de concentración final de 0,01 a 5,0%.

En una forma de realización igualmente preferente del procedimiento de la invención, se añaden a la solución para una liofilización, uno o varios lioprotectores en un rango de concentración final de 4,0 a 10% y crioprotectores en un rango de concentración final de 0,01 a 1,0%. Los lioprotectores actúan a este respecto para proteger sustancias en el secado. Los crioprotectores tienen un objetivo correspondiente durante la congelación. Los rangos de concentración final que se han indicado para la utilización de lioprotectores y/o crioprotectores son preferentes, siendo por lo tanto, comprendidos dentro del procedimiento de la invención, asimismo, zonas de concentración final que se encuentran fuera de las zonas o rangos de concentración final preferentes. Los lioprotectores se utilizan en un rango de concentración final de 4,0 a 10%. En combinación con los lioprotectores o también en su ausencia, los crioprotectores son preferentes en un rango de concentración final de 0,05 a 0,1% de la solución.

Preferentemente, se utilizan dextrans con una masa molecular de 1000 a 100000 Da y de manera especialmente preferente, de 1000 a 10000 Da. Tal como en los ejemplos que se han descrito y documentado, los dextrans constituyen lioprotectores preferentes que pueden ser utilizados sin "Mannit", pero que pueden ser utilizados también junto con otros lioprotectores en el procedimiento de la invención. Tal como muestran los ejemplos, los dextrans

- 5 pueden ser utilizados también solos de manera preferente sin otros lioprotectores en el procedimiento de la invención. La adecuación individual de los dextrans como lioprotectores en el procedimiento de la invención, en especial en el proceso de liofilización, es sorprendente puesto que se ha indicado en el estado de la técnica, que el dextrano solo puede proporcionar un efecto de estabilización de proteínas como sustancia acompañante (Carpenter y otros, 1993, Carpenter y otros, 1999, Allison y otros, 1999, Allison y otros, 2000).
- 10 De manera correspondiente, se utilizan sustancias iónicas como crioprotectores. Estas sustancias iónicas son escogidas nuevamente de modo preferente del grupo que comprende cloruro sódico, sulfato sódico, cloruro potásico y sulfato potásico. Igualmente, corresponde a la invención la utilización de sales de sodio de ácido editico. Estas sales conducen por formación de complejos de los iones metálicos introducidos en el proceso de fabricación, a una estabilización adicional de los polipéptidos.
- 15 De manera correspondiente al procedimiento de la invención, los lioprotectores y los crioprotectores constituyen en la liofilización, estructuras amorfas. Estos lioprotectores y crioprotectores impiden que durante el proceso de liofilización se formen retículas cristalinas (separaciones constantes de átomos) en una sustancia. La ausencia de estructuras cristalinas en una sustancia puede ser demostrada por un análisis estructural cristalina en polvo (por ejemplo, mediante difracción de radiaciones de rayos x).
- 20 En otra forma de realización preferente del procedimiento, se utilizan aminoácidos como estabilizadores. Preferentemente, estos son utilizados en una concentración de 0,01 a 50 mg/ml. Adicionalmente, a efectos de características estabilizantes, se pueden utilizar aminoácidos según la invención también en forma de sustancias tampón.
- 25 De manera preferente, los aminoácidos son escogidos del grupo que comprende aminoácidos ácidos, tales como ácido glutámico y ácido asparagínico, el aminoácido básico arginina y el aminoácido neutro valina.
- 30 En otra forma adicional de realización del procedimiento de la invención, el polipéptido que comprende, como mínimo, un polipéptido fijador de carbohidratos, recombinante, o un derivado funcional o un fragmento del polipéptido fijador de carbohidratos, recombinante, en una concentración final de 0,000001% (10ng/ml) a 1,0% (10mg/ml). Es especialmente preferente una concentración de proteínas de 0,000001% (100ng/ml) a 1,0% (1mg/ml).
- 35 Una forma de realización igualmente preferente del procedimiento comprende la formulación adicional o reconstitución del medicamento como solución acuosa o no acuosa. Esto comprende, además, la formulación adicional del medicamento como solución de inyección, de instilación o de infusión. De acuerdo con la invención, las soluciones de inyección se administran dependiendo de las afecciones o enfermedades a tratar de forma subcutánea, intramuscular, intravenosa, intracardiaca o intraperitoneal. Las soluciones para la instilación en una cavidad corporal son instiladas dependiendo de la afección a tratar, por ejemplo, en la vejiga de la orina.
- 40 En otra forma preferente de realización del procedimiento, se incluye además la formulación adicional o reconstitución del medicamento para utilizaciones gastrointestinal, oral, nasal, pulmonar, dérmica, transdérmica o local.
- 45 Es además preferente la formulación del medicamento como jarabe, cápsulas, tabletas, supositorios o geles.
- 50 50 Los denominados geles, que son fabricados por formulación adicional del medicamento de la invención, pueden ser conseguidos por la utilización de formadores de hidrogeles inorgánicos y orgánicos juntamente con soluciones acuosas o acuosas/alcohólicas. En este concepto, los formadores de hidrogeles son de origen natural, sintético-parcial y sintético. Es común en estas moléculas una capacidad de hinchamiento en parte de características extremas que lleva a la constitución de geles extendibles.
- 55 Es igualmente preferente además, la formulación adicional del medicamento para conseguir un material en polvo para inhalación, el cual es administrado con un inhalador.
- 55 La invención se refiere además a un medicamento que es fabricado de acuerdo con uno de los procedimientos de la invención.
- 60 Igualmente, la invención se refiere a la utilización de un polipéptido para la fabricación de dicho medicamento.
- 65 La administración del medicamento, según la invención, puede tener lugar, dependiendo de la formulación prescrita, por diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, local o intradérmica. El tipo de dosificación se determina por el médico que efectúa el tratamiento de manera correspondiente a factores clínicos. Es conocido por el experto que el tipo de la dosificación depende de diferentes factores tales como, por ejemplo, la dimensión, la superficie corporal, la edad, el estado o la salud en general del paciente y, asimismo, de medios especiales por los que se efectúa la administración, de la duración y tipo de administración y de otros medicamentos que pueden ser administrados posiblemente de forma paralela.

En las figuras,

La figura 1 muestra la variación del valor de pH de una solución tampón dependiendo de la temperatura. La solución tampón corresponde a un tampón de fosfato 20mM y contiene, además, 0,1% de cloruro sódico. Esta solución tampón fue enfriada, tal como se ha descrito en el ejemplo 1, en un criostato de tipo comercial con control de temperatura. El valor de pH en la solución se determinó con electrodos de pH especiales de tipo apropiado. La velocidad de enfriamiento ascendió en la prueba mostrada a 1,2 K. El desarrollo de la curva mostrada indica que el enfriamiento de la solución tampón desde RT al punto de congelación de la solución no tiene ninguna influencia significativa en el valor de pH de esta solución. Si la solución es enfriada a temperaturas por debajo del punto de congelación, se observa una reducción significativa del valor del pH de 8 a menos de 5.

La figura 2, muestra la estabilidad de rViscumin específica de carbohidratos dependiendo del valor de pH y de un almacenamiento durante tiempo reducido a 2-8°C, encontrándose rViscumin en una solución salina tamponada.

La solución tampón corresponde a un tampón fosfato 20mM (pH 7,2), que fue ajustada con NaOH (1 M y 0,1 M) o bien HCl (10% o bien 1%) a un valor de pH de 3, 4, 5, 7, 8 y 9. Las soluciones tamponadas con fosfato contienen además NaCl en una concentración de 0,7 a 0,9% para el ajuste de la isotonía de las soluciones, y polivinilpirrolidona de bajo peso molecular en una concentración de 0,1 g/l para evitar la adsorción del polipéptido en la superficie del recipiente.

En la prueba mostrada en la figura, se observó que la estabilidad del polipéptido rViscumin en las soluciones tamponadas, disminuye al disminuir el valor de pH. Por debajo de un valor de pH 6, no existe ya después de un tiempo corto de almacenamiento rViscumin con propiedades específicas de carbohidratos.

La figura 3, muestra la estabilidad de rViscumin (rML) específico de carbohidratos en una solución estabilizada y tamponada y el material en polvo conseguido de la misma mediante liofilización (liofilizado) con dependencia de la temperatura.

La solución tampón corresponde a un tampón TRIS/HCl 200 mM (pH 8,0), que contiene 8,0% (p/v) dextrano T10, 0,1% (p/v) NaCl y 0,1% (p/v) Polysorbat 80. El rViscumin se encuentra en una concentración de 2,0µg/ml en la solución. La solución es dividida, tal como se describe en el ejemplo 3, tratada y sometida a investigación.

El resultado de la investigación mostrado en la figura, indica que el contenido de rViscumin en la solución estabilizada y tamponada, disminuye desde una temperatura de 40°C fuertemente. A 50°C, se muestran todavía solamente el 50% de la concentración de salida de rViscumin con propiedades específicas de carbohidratos. A 60°C, no se detecta cantidad alguna de rViscumin específica de carbohidratos. La temperatura de descomposición de rViscumin en solución se encuentra, por lo tanto, entre 40°C y 50°C.

El contenido detectado de rViscumin con propiedades específicas de carbohidratos en cuerpos sólidos disminuye solamente de manera muy lenta con la elevación de la temperatura. Para una temperatura de 50°C, se puede detectar todavía un contenido de 94%, y a 60°C un contenido de 91% del contenido inicial.

Figura 4

La figura 4 muestra la dependencia de la actividad de fijación a carbohidratos de rViscumin en solución acuosa con la variación del valor del pH.

Figura 5

La figura 5 muestra la dependencia de la estabilidad de la actividad de unión de carbohidratos del rViscumin en solución acuosa y como material en polvo liofilizado con el aumento de la temperatura.

Figura 6

La figura 6 muestra la influencia que tienen las sustancias auxiliares Pluronic F68 y Polysorbat 80 en sus propiedades como crioprotectores sobre la etapa de proceso de congelación/descongelación de una solución acuosa de rViscumin en tampón TRIS 100 mM pH 8,0. Las soluciones contienen el lioprotector dextrano T1 en una concentración de 2% que se encuentra por debajo del rango preferente.

Figura 7

Al figura 7 muestra la influencia que la concentración de proteínas de una solución acuosa de rViscumin presenta sobre el proceso de liofilización.

Figura 8

La figura 8 muestra la influencia que tiene el lioprotector Mannit y una mezcla de Mannit junto con un lioprotector no cristalizante sobre rViscumin.

Figura 9

La figura 9 muestra la adecuación y el rango óptimo del lioprotector dextrano T1 sobre la estabilidad de rViscumin durante la liofilización.

Figura 10

La figura 10 muestra la influencia de diferentes lioprotectores sobre la estabilidad de preparados de rViscumin liofilizados a una temperatura que se ha elevado a 60°C.

Figura 11

La figura 11 muestra la estabilidad en almacenamiento de una preparación acuosa de rViscumin (Quadrat) a lo largo de 10 semanas y un liofilizado (Rauten) a lo largo de 56 semanas a una temperatura de almacenamiento de 2-8°C.

Ejemplo de referencia 1:

Procedimiento para la comprobación del valor de pH durante el enfriamiento por congelación de medicamentos

rViscumin es una proteína dímera, preparada de forma recombinante, de plantas con actividades de unión específica del azúcar. El efecto farmacológico de la proteína, inicio de apoptosis de células, se correlaciona con el mantenimiento de la actividad de unión específica de azúcar. El mantenimiento de la especificidad del azúcar depende fuertemente del valor de pH del medio circundante. Con un valor de pH del medio en descenso, disminuye fuertemente para un valor del pH menor de 6,0, la actividad de unión del azúcar del rViscumin. Esto se refiere también para una variante de pH durante el proceso de congelación en la liofilización de preparados acuosos con rViscumin. Por esta causa, el control del pH de sistemas tampón es necesario durante la congelación de preparados de medicamentos de rViscumin dentro del ámbito de la liofilización.

El objetivo puede ser conseguido de manera que se pueden preparar compuestos farmacéuticos de rViscumin o su composición base sin sustancia activa (combinación de las sales tampón) en un volumen de 15 ml en recipientes de congelación habituales (viales). Los recipientes de congelación son dispuestos en un criostato de tipo comercial con control de temperatura. Se utilizan electrodos de pH adecuados especiales (por ejemplo, los electrodos resistentes a la presión Sure-Flow pHuture Probe con convertidor modelo 605-suministro de tensión para electrodos ISFET, Orion o electrodos de cristal resistentes a la congelación (de la firma Schott Geräte GmbH, Hofheim). La designación de los valores de pH tiene lugar con medidores comerciales de pH. Una velocidad de enfriamiento de 1,2 K es apropiada para constituir la simulación de la velocidad de enfriamiento de los aparatos de liofilización. Los valores de pH en la solución se miden con dependencia de la temperatura.

En la figura 1 se ha mostrado el desarrollo del valor de pH de un tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 8,0 a RT) según la temperatura.

Los tampones de fosfato muestran, con la reducción de la temperatura por debajo de 0°C, una fuerte reducción del valor de pH, tal como se puede justificar en el ejemplo del tampón de fosfato 20 mM con cloruro sódico a 0,1% (p/v) con el procedimiento descrito. Esto permite concluir una variación física del sistema de tampón. Es conocido que el fosfato monohidrogenado de sodio con temperatura decreciente cristaliza a partir de soluciones tamponadas acuosas, y de esta forma condiciona esta variación del pH.

Se han descrito ya preparados acuosos de rViscumin en el documento EP 0 751 221 B1. Estas preparaciones adecuadas, medicamentos, son soluciones acuosas tamponadas con fosfato pH 7,2 y una concentración de rViscumin de 100 - 200 ng/ml y teniendo, por ejemplo, la siguiente composición:

rViscumin	100 ng
Fosfato sódico monohidrogenado dihidratado	3,56 mg
Fosfato sódico dihidrogenado dihidratado	0,64 mg
Cloruro de sodio	67,0 mg
Poli(1-vinil-2-pirrolidona) K 17	0,5 mg
Agua para inyección	hasta 1 ml

Los tampones de fosfato pH 7,2 muestran en el enfriamiento y congelación una reducción dependiente de la disminución de temperatura del valor de pH, tal como se ha medido también para el tampón fosfato pH 8,0 y se describe en la figura 1. Es conocido por los técnicos en la materia que los valores iniciales reducidos de pH en la congelación de la solución acuosa conducen a fuertes desplazamientos en la zona ácida, puesto que aumenta la

concentración de fosfato de sodio dihidrogenado. Si las preparaciones, composición antes indicada, son liofilizadas, ello conduce forzosamente a unas condiciones de pH más reducido por debajo de pH 6, por debajo del cual el rViscumin no es estable y se produce la desnaturalización de la proteína con pérdida de actividad, tal como se muestra en la figura 5 para preparados acuosos de rViscumin.

- 5 Las variaciones de pH de los tampones biológicos TRIS/HCl, TRICIN/HCl y Hepes/HCl pH 8,0 se muestran y se explican en la obra de Gloger O., Müller B.W., 2000.
- 10 Los sistemas de tampón que comprenden TRIS/HCl, TRICIN/HCl y Hepes/HCl ajustados a un valor de pH 8,0 muestran, con la reducción de la temperatura, una reducida variación continua del pH hacia valores de pH más elevados, hasta 9,0 (Gloger O., Müller B.W., 2000).

Ejemplo de referencia 2: estabilidad de rViscumin específico de carbohidratos con dependencia del valor de pH y tiempo reducido de almacenamiento

- 15 Se disuelve rViscumin con una concentración de 200 ng/ml en diferentes tampones. Partiendo de un tampón de fosfato 20 mM (pH 7,4) se preparan con NaOH (1 M y 0,1 M) o bien HCl (10% o bien 1%) tampones con valores de pH 3, 4, 5, 7, 8 y 9. Las soluciones tamponadas con fosfato contienen además NaCl con una concentración final de 0,7-0,9% para el ajuste de la isotonía de la solución y polivinilpirrolidona con reducido peso molecular en una concentración de 0,1 g/l para evitar la adsorción del polipéptido en la superficie del recipiente. Las soluciones son filtradas con la separación de bacterias sobre una membrana (dimensiones de poros 0,2 μ m) y son dispuestas en recipientes cerrados de polietileno a temperatura controlada a 2-8°C. Con dependencia del tiempo, se han sacado muestras. Estas muestras son diluidas 1:10 con tampón fosfato 2 mM (pH 7,4) para conseguir soluciones para la determinación del contenido de proteínas con actividad de lectina mediante un inmunoensayo específico acoplado a enzimas con utilización de una glicoproteína y un anticuerpo monoclonal específico. Un ejemplo de ensayo para la determinación del contenido de proteínas de una solución con actividad de lectina se muestra en el ejemplo 4.

- 20 La investigación mostrada en la figura 2 muestra que la estabilidad del polipéptido rViscumin en soluciones tamponadas disminuye con la disminución del pH fuertemente. Por debajo de un valor de pH 6 no existe, después de un corto periodo de almacenamiento, ningún rViscumin con actividad de lectina en las soluciones. La estabilidad más elevada de rViscumin, con mantenimiento de la actividad de lectina, se observa para valores de pH elevados.

Ejemplo de referencia 3: Estabilidad de rViscumin (rML) liofilizado

- 35 El rViscumin está disuelto en una concentración de 2,0 μ g/ml en una solución estabilizada y tamponada de tampón Tris/HCl 200 mM (pH 8,0), 8,0% (p/v) dextrano T10, 0,1% (p/v) de NaCl y 0,1% (p/v) de Polysorbat 80. Una parte de esta solución es transferida en condiciones asépticas mediante liofilizado pasando a material en polvo. Para ello, 0,5 ml de la solución se llenan en viales de vidrio después de filtrado de bacterias a través de un filtro de 0,2 μ m, se tapa parcialmente con un tapón de liofilización y se seca en una instalación de liofilizado. La otra parte es igualmente filtrada de bacterias, llenada en viales de vidrio y cerrada almacenándola hasta el ensayo a 2-8°C.

40 Despues de liofilización, tanto los viales de vidrio con soluciones acuosas como también los que contienen cuerpos sólidos (solución seca), son dispuestos en un baño de agua controlado con control de temperatura y tiempo. Los viales de vidrio fueron dispuestos a las siguientes temperaturas:

- 45 5 minutos a 30°C
calentamiento con aumento de temperatura de 1,5°C/minuto
5 minutos a 40°C
calentamiento con aumento de temperatura de 1,5°C/minuto
- 50 5 minutos a 50°C
calentamiento con aumento de temperatura de 1,5°C/minuto
5 minutos a 60°C

- 55 El contenido de proteínas con actividad de lectina de las muestras seleccionadas de la solución y del cuerpo sólido se determinó después de la conducción a temperatura mediante un inmunoensayo acoplado a enzimas de tipo específico con utilización de una glicoproteína y un anticuerpo monoclonal específico. Un ejemplo para un ensayo para la determinación del contenido de proteínas de una solución con actividad de lectina se describe en el ejemplo 4.

- 60 El ensayo mostrado en la figura 3 indica que el contenido de rViscumin en la solución tamponada y estabilizada disminuye fuertemente desde una temperatura de 40°C. A 50°C se detecta solamente 50% de la concentración inicial de rViscumin con actividad de lectina. Después de que la solución ha sido calentada a 60°C, no se puede encontrar contenido alguno de rViscumin con actividad de lectina. La temperatura de descomposición de rViscumin en solución se debe estimar, por lo tanto, entre 40°C y 50°C. El contenido de rViscumin con actividad de lectina en los cuerpos sólidos aumenta solamente de manera muy lenta con la elevación de la temperatura. A una temperatura de 50°C se halla un contenido de 94% y a 60°C un contenido de 91% del contenido de partida de rViscumin con

actividad de lectina. Esto muestra que el polvo liofilizado de rViscumin es esencialmente más estable que en la solución.

Ejemplo de referencia 4: Determinación del contenido de proteína de una solución con actividad de lectina

100 µl de una solución de 0,1 mg/ml de asialofetuína en tampón de carbonato a pH 9,6 son dispuestos en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con elevada unión de proteínas y sometidos a incubación durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS con un contenido de 0,05 g/l de Polysorbat 80, los pocillos de la placa de microtitulación fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl de PBS conteniendo 10 g/l de albúmina de suero bovino y 0,05 g/l de Polysorbat 80 (bloqueo de lugares de unión no específicos). Después de tres lavados, se disponen en los pocillos 100 µl de solución de referencia de rViscumin en cada uno de ellos en un rango de concentración de 10-200 ng/ml, 100 µl de la solución de ensayo y 100 µl del tampón (PBS con 0,05 g/l de Polysorbat 80) para la determinación del valor en vacío, y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, los pocillos de la placa de microtitulación son lavados recibiendo la adición de 100 µl de una solución de un anticuerpo de detección monoclonal específico (IgG de ratón de cadena A anti-rViscumin) con una concentración de 1 µg/ml en PBS conteniendo 0,05 g/l de Polysorbat 80 y 0,1 g/l de albúmina de suero bovino, efectuándose incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos de las placas de microtitulación son lavados tres veces y reciben la adición de 100 µl de un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (POD) con una dilución correspondiente a las instrucciones de los suministradores efectuándose incubación durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos de la placa de microtitulación son lavados seis veces y a continuación reciben la adición de 100 µl de una solución de una tableta ortofenilendiamina/H₂O₂ de tipo comercial en 25 ml de tampón citrato pH 5 con incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de 15 minutos, se facilita a cada uno de los pocillos 100 µl de ácido sulfúrico 1 M y se determina la intensidad de la coloración de la solución por medición de absorción.

25 El contenido en las soluciones de ensayo se determina por comparación con las soluciones de referencia.

Ejemplo 5: Solución de inyección de rViscumin 10 µg/ml (liofilizado) conteniendo dextrano

30 Se describen varias composiciones para soluciones de inyección que contienen dextrano.

Para ello, se disolvieron Polysorbat, tris-base y dextrano en el 80% de la cantidad necesaria de agua a efectos de inyección. A continuación, se ajusta el pH con HCl (1 N) a 8,0. En esta solución se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante, se amplía al volumen teórico requerido. A continuación, la solución es sometida a filtrado estéril sobre un filtro de 0,2 µm. La solución es dispuesta en condiciones asépticas en viales de vidrio, cerrada previamente con tapones de liofilizado, y secada en la instalación de liofilización.

Composición con dextrano T1	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-base	24,2 mg
HCl (1 N)	para pH 8,0
Dextrano T 1	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

40 Se describe además una composición que comprende adicionalmente NaCl. Éste se disuelve simultáneamente con Polysorbat, tris-base y dextrano en agua.

Composición con dextrano T1 y NaCl	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-base	24,2 mg
HCl (1 N)	para pH 8,0
NaCl	1 mg
Dextrano T 1	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

45 En el último ejemplo para este grupo de compuestos de rViscumin se describe además la preparación de una solución de inyección de rViscumin que comprende, además de NaCl, Na-EDTA. Éstos fueron disueltos simultáneamente con Polysorbat, tris-base y dextrano en agua.

Composición con dextrano T1 y NaCl y Na-EDTA	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-Base	24,2 mg

HCl (1 N)	para pH 8,0
EDTA disódico	0,01 mg
NaCl	1 mg
Dextrano T 1	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

Para la reconstitución del liofilizado, los componentes de los ejemplos mostrados son dispuestos en las cantidades de agua indicadas.

- 5 Ejemplo de referencia 6: Solución de inyección de rViscumin 10 µg/ml (liofilizado) que contiene ciclodextrina β-HP

Composición con ciclodextrina β-HP	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-Base	24,2 mg
HCl (1 N)	para pH 8,0
EDTA disódico	0,01 mg
Ciclodextrina β-HP	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

- 10 Para la preparación de esta solución de inyección, se disolvieron Polysorbat, tris-base, ácido edetindisódico y β-hidroxipropil-ciclodextrina en 80% de la cantidad necesaria para inyección. A continuación, se ajusta el pH con HCl (1 N) a 8,0. En esta solución, se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante, se amplía al volumen teórico requerido. A continuación, la solución es sometida a filtrado estéril con un filtro de 0,2 µm. La solución es llenada en viales de vidrio en condiciones asépticas, se cierran previamente con tapones de liofilización y se secan en la instalación de liofilización.

- 15 Ejemplo de referencia 7: Solución acuosa de rViscumin 10 µg/ml (liofilizado) que contiene aminoácidos

- 20 La preparación de las soluciones tiene lugar según el proceso descrito en el ejemplo 4. De manera correspondiente, se disuelve Polysorbat, tris-base, cloruro sódico y los aminoácidos en el 80% de la cantidad de agua necesaria para inyección. Las soluciones son llenadas en condiciones asépticas en ampollas de vidrio o frascos de vidrio. El medicamento es estable en las condiciones de almacenamiento de 2-8°C.

Composición con ácido glutámico	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-Base	2,4 mg
HCl (1 N)	para pH 8,0
NaCl	6,5 mg
Ácido glutámico	0,1 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

Composición con ácido glutámico y valina	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-Base	2,4 mg
HCl (1 N)	para pH 8,0
NaCl	6,5 mg
Ácido glutámico	0,1 mg
Valina	10 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

- 25 Si se añaden a las soluciones antes del llenado 80 mg de dextrano T1, se pueden preparar de manera correspondiente los liofilizados.

Ejemplo de referencia 8: Influencia de diferentes aminoácidos sobre la estabilidad de soluciones salinas tamponadas de rViscumin específico de carbohidratos

- 30 En el curso de la descripción, se demostró que representantes de aminoácidos con propiedades ácidas, neutras y básicas están en condiciones de estabilizar el polipéptido rViscumin en soluciones acuosas tamponadas.

La investigación reunida en las siguientes tablas manifiesta las diferentes influencias de los aminoácidos sobre la estabilización de rViscumin en soluciones salinas acuosas tamponadas para un valor de pH de 8,0.

Aminoácido	Concentración mg/ml	Valor inicial contenido (%)	Contenido (%) 3 días en almacenamiento
ninguno	-	100%	21,7%
ácido glutámico	0,1	100%	100%
	10	100%	100%
valina	0,1	100%	24,2%
	10	100%	91,3%
arginina	0,1	100%	74,2%
	10	100%	30,5%

Si se almacena la solución de rViscumin durante tres días a 2-8°C, después de este periodo de tiempo se puede detectar todavía el 22% de rViscumin específico de carbohidratos.

- 5 Si, por el contrario, la solución recibe la añadidura del aminoácido ácido glutámico de tipo ácido, que se utiliza en este caso como ejemplo de un aminoácido ácido, se puede hallar todavía, después de tres días de almacenamiento correspondientes, el 100% del polipéptido rViscumin específico de carbohidratos. Este efecto estabilizante se observa en el rango de concentración 0,1-10 mg/ml.
- 10 Si se añade un aminoácido neutro, tal como, por ejemplo, valina, se observa de modo correspondiente una estabilización del polipéptido en solución acuosa. Para este aminoácido, todo el rango de concentración efectivo de estabilización se encuentra en 10 mg/ml. Se encuentran después de tres días de almacenamiento todavía 91% del contenido inicial de rViscumin.
- 15 De manera sorprendente, se pudo observar también con aminoácidos con propiedades básicas en el rango de concentración reducido de 0,1 mg/ml, un efecto estabilizador de la proteína. La cantidad de la proteína que se encuentra de nuevo en la correspondiente solución, con un contenido de 74%, está notablemente por encima del contenido observado de 22% en el control.
- 20 Por lo tanto, los aminoácidos tienen como aditivos un efecto estabilizante, tanto en soluciones acuosas como también como aditivos en composiciones secas (polvo, liofilizado) de rViscumin.

Ejemplo de referencia 9: solución acuosa de rViscumin, concentrado para infusión de 200 µg

- 25 Se describe a continuación un ejemplo para la preparación de una solución, o bien de un concentrado, de rViscumin para infusión:

Composición con ácido glutámico	
rViscumin	0,20 mg
Polysorbat 80	10 mg
Tris-base	24,1 mg
HCl (1N)	para pH 8,0
NaCl	65 mg
Ácido glutámico	1 mg
Agua para inyección	hasta 10 ml

- 30 La preparación de la solución tiene lugar según el proceso descrito en el ejemplo 4. De manera correspondiente, el Polysorbat, tris-base, cloruro sódico y ácido glutámico se disuelven en el 80% de la cantidad requerida de agua para inyección. A continuación, el pH se ajusta a 8,0 con HCl (1N). En esta solución, se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante se aumenta al volumen teórico requerido y la solución es filtrada a esterilidad sobre un filtro de 0,2 µm. La solución es llenada en frascos de vidrio en condiciones asépticas. El medicamento es estable en condiciones de almacenamiento de 2-8°C.
- 35 Si se añaden a la solución antes del llenado 800 mg de dextrano T1, se puede preparar de manera correspondiente un liofilizado.

Ejemplo de referencia 10: solución acuosa para instilación de rViscumin 500 µg

- 40 A continuación se explica un ejemplo para la preparación de una solución de rViscumin para la instilación en una cavidad corporal:

Composición con ácido glutámico	
rViscumin	0,5 mg
Polysorbat 80	500 mg
Tris-base	121,1 mg
HCl (1N)	para pH 8,0
NaCl	350 mg
Ácido glutámico	5 mg
Agua para inyección	hasta 50 ml

La preparación de la solución tiene lugar según el procedimiento descrito en el ejemplo 4. De manera correspondiente, se disuelve Polysorbat, tris-base, cloruro sódico y ácido glutámico en el 80% de la cantidad de agua necesaria para inyección. A continuación se ajusta el pH a 8,0 con HCl (1N). En esta solución se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante se amplía el volumen teórico requerido y la solución es filtrada a esterilidad con un filtro de 0,2 μ m. La solución es llenada en frascos de vidrio en condiciones asépticas. El medicamento es estable en las condiciones de almacenamiento de 2-8°C.

Si se añade la solución antes del llenado de 2,0 g de dextrano T1, se puede preparar igualmente un liofilizado.

Ejemplo de referencia 11: solución de rViscumin 10 μ g/ml (liofilizado) que contiene glucosa

Tal como se ha descrito en lo anterior, en una forma de realización preferente de la invención se añadirá azúcar a la solución de rViscumin. Un ejemplo para la preparación de dicha solución, que será liofilizada a continuación, se explica a continuación:

Composición con glucosa y NaCl	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-base	24,2 mg
HCl (1N)	para pH 8,0
NaCl	1 mg
Glucosa	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

Se disuelve Polysorbat, tris-base y glucosa en el 80% de la cantidad de agua necesaria para inyección. A continuación se ajusta el pH a 8,0 con HCl (1N). En esta solución, se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante se amplía al volumen teórico necesario. A continuación, la solución es filtrada a esterilidad sobre un filtro de 0,2 μ m. La solución es llenada en viales de vidrio en condiciones asépticas, se cierra de forma previa con tapones de liofilización y se seca en la instalación de liofilización.

Ejemplo de referencia 12: solución de rViscumin que contiene sorbitol 10 μ g/ml (liofilizado)

Tal como se ha descrito en lo anterior, en otra forma de realización preferente de la invención se añade sorbitol a la solución de rViscumin. Un ejemplo para la preparación de dicha solución, que será liofilizada a continuación, se explica a continuación:

Composición con sorbitol y NaCl	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-base	24,2 mg
HCl (1N)	para pH 8,0
NaCl	1 mg
Sorbitol	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

Se disolvieron Polysorbat, tris-base y sorbitol en el 80% de la cantidad de agua necesaria para inyección. A continuación se ajustó el pH a 8,0 con HCl (1N). En esta solución, se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante se amplía hasta el volumen teórico necesario. A continuación, la solución es filtrada a esterilidad sobre un filtro de 0,2 μ m. La solución es llenada en viales de vidrio en condiciones asépticas con cierre previo con tapones de liofilización y secada en la instalación de liofilización.

Ejemplo de referencia 13: solución de rViscumin que contiene quitosano 10 µg/ml (liofilizado)

Composición con sorbitol y NaCl	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-base	24,2 mg
HCl (1N)	para pH 8,0
NaCl	1 mg
Quitosano (peso molecular reducido)	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

- 5 Se disolvieron Polysorbat, tris-base, y quitosano en el 80% de la cantidad de agua necesaria para inyección. A continuación, se ajustó el pH a 8,0 con HCl (1N). En esta solución, se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante, se amplía hasta el volumen teórico necesario. A continuación, la solución es filtrada a esterilidad sobre un filtro de 0,2 µm. La solución es llenada en viales de vidrio en condiciones asépticas con cierre previo con tapones de liofilización y secada en la instalación de liofilización.

10 Ejemplo de referencia 14: solución de rViscumin que contiene aerosil 100 µg/ml (liofilizado)

Composición con dióxido de silicio	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-base	24,2 mg
HCl (1N)	para pH 8,0
Dióxido de silicio (coloidal)	20 mg
Dextrano T1	60 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

- 15 Se disolvieron Polysorbat, tris-base y dextrano en el 80% de la cantidad de agua necesaria para inyección. A continuación, se ajustó el pH a 8,0 con HCl (1N). En esta solución, se dispone el rViscumin y el dióxido de silicio coloidal y se mezcla bien. Con el agua restante, se amplía hasta el volumen teórico necesario. La solución es llenada en viales de vidrio en condiciones asépticas con cierre previo con tapones de liofilización y secada en la instalación de liofilización.

20 Ejemplo de referencia 15: solución de rViscumin que contiene povidona 10 µg/ml (liofilizado)

Composición con polivinilpirrolidona y NaCl	
rViscumin	0,01 mg
Polysorbat 80	1 mg
Tris-base	24,2 mg
HCl (1N)	para pH 8,0
NaCl	1 mg
Polivinilpirrolidona K17	80 mg
Agua para inyección	hasta 1,0 ml

- 25 Se disolvieron Polysorbat, tris-base y polivinilpirrolidona en el 80% de la cantidad de agua necesaria para inyección. A continuación, se ajustó el pH a 8,0 con HCl (1N). En esta solución, se dispone el rViscumin y se mezcla bien. Con el agua restante, se amplía hasta el volumen teórico necesario. A continuación, la solución es filtrada a esterilidad sobre un filtro de 0,2 µm. La solución es llenada en viales de vidrio en condiciones asépticas, con cierre previo con tapones de liofilización y secada en la instalación de liofilización.

30 Ejemplo de referencia 16: rViscumin en polvo para la preparación de una solución, solución de rViscumin 10 mg para toma oral

Se explicarán ejemplos para la preparación de rViscumin en polvo, que es preparado como material en polvo para una aplicación oral posterior y se disuelve en agua antes de la utilización:

Composición con dextrano		
1.	rViscumin	10 mg
2.	Polysorbat 80	100 mg
3.	Tris-base	24 mg
4.	HCl (1N)	para pH 8,0
5.	Dextrano T1	10 g
6.	Sacarosa	10 g

Las posiciones 1-4 y parte de 5 (dextrano T1 actúa en esta composición como sustancia lioprotectora) son disueltas en agua purificada hasta 10 ml y llevado a estado de polvo mediante liofilización. Este material en polvo puede ser almacenado.

- 5 El material en polvo es mezclado, tal como en los ejemplos anteriores, con el resto de sustancias y es llenado en frascos de 100 ml. Para la preparación de la solución, las sustancias son disueltas en agua hasta 100 ml.
- Las posiciones 1-5 y parte de 6 (sacarosa actúa en esta composición como sustancia lioprotectora) fueron disueltas en agua purificada hasta 10 ml y llevado a estado de polvo mediante liofilización. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es mezclado, tal como en los ejemplos anteriores, con el resto de sustancias y es llenado en frascos de 100 ml. Para la preparación de la solución la sustancia es disuelta en agua hasta 100 ml.

Composición con sacarosa (sucrosa)		
1.	rViscumin	10 mg
2.	Polysorbat 80	100 mg
3.	Tris-base	120 mg
4.	Ácido glutámico	10 mg
5.	HCl (1N)	para pH 8,0
6.	Sacarosa	10 g
7.	Aromas	0,1 mg
8.	Sorbitol	10 mg
9.	Aqua	hasta 100 ml

Ejemplo de referencia 17: rViscumin en polvo para la preparación de una solución, solución de 10 mg rViscumin en jarabe para toma oral

- 15 Se describe a continuación un ejemplo para la preparación de rViscumin en polvo que es elaborado para una aplicación oral subsiguiente en forma de polvo para la preparación de un jarabe, y antes de la aplicación es disuelto nuevamente en agua:

Composición con sacarosa (sucrosa)		
1.	rViscumin	10 mg
2.	Polysorbat 80	100 mg
3.	Tris-base	24 mg
4.	HCl (1 N)	para pH 8,0
5.	Sacarosa	25 g
6.	Hidroxietilcelulosa 400	700 mg
7.	Goma xantano	300 mg
8.	Aromas	0,1 mg
9.	Glicerol 85%	1 g
10.	Sorbitol	10 g

- 20 Las posiciones 1-4 y parte de la 5 fueron disueltas en agua purificada hasta 10 ml mediante liofilización y preparadas en forma de polvo. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es mezclado de forma conocida con las otras sustancias y llenado en frascos de 100 ml. Para la preparación del jarabe, la sustancia es disuelta en agua hasta 100 ml. Despues de mantenimiento del tiempo de espera, el jarabe está en condiciones de administración.

Ejemplo 18: tabletas de rViscumin 0,1/0,5 mg

Tabletas de 250 mg para administración oral

- 30 Se muestran a continuación ejemplos de preparación de tabletas de rViscumin:

Composición con dextrano/celulosa		
1.	rViscumin	0,1 mg
2.	Lecitina de soja	10 mg
3.	Tris-base	24 mg
4.	HCl (1 N)	para pH 8,0
		para pH 8,0

5	Dextrano T1	100 mg	100 mg
6.	Celulosa microcristalina	99 mg	99 mg
7.	Dióxido de silicio altamente disperso (Aerosil)	5 mg	5 mg
8.	Polivinilpirrolidona reticulada (Kollidon CL)	5 mg	5 mg
9.	Estearato magnésico	1 mg	1 mg

Las posiciones 1-5 son disueltas con agua purificada hasta 2 ml y preparadas en forma de polvo mediante liofilización. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es mezclado de forma conocida con las demás sustancias siendo prensado en forma de tabletas. Estas tabletas pueden ser dotadas de una laca de tipo habitual que impide la liberación de la sustancia en el estómago (liberación retardada).

Composición con sorbitol			
1.	rViscumin	0,1 mg	0,5 mg
2.	Polysorbat 80	10 mg	10 mg
3.	Tris-base	24 mg	24 mg
4.	HCl (1 N)	para pH 8,0	para pH 8,0
5	Sorbitol	200 mg	200 mg
6.	Dióxido de silicio altamente disperso (Aerosil)	5 mg	5 mg
7.	Carboximetilcelulosa sódica (Tilopur)	5 mg	5 mg
8.	Estearato magnésico	1 mg	1 mg

10 Las posiciones 1-4 fueron disueltas en agua purificada hasta 2 ml y mediante liofilización preparadas en forma de polvo. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es mezclado de forma conocida con las demás sustancias siendo prensado en forma de tabletas. Estas tabletas pueden ser dotadas de una laca de tipo habitual que impide la liberación de la sustancia en el estómago (liberación retardada).

Composición con dextrano			
1.	rViscumin	0,1 mg	0,5 mg
2.	Polysorbat 80	5 mg	5 mg
3.	Tris-base	12 mg	12 mg
4.	HCl (1 N)	para pH 8,0	para pH 8,0
5	Dextrano T1	40 mg	40 mg
6.	Celulosa microcristalina	57 mg	57 mg
7.	Dióxido de silicio altamente disperso (Aerosil)	5 mg	5 mg

15 Las posiciones 1-5 son disueltas con agua purificada hasta 1 ml y se llevan a estado de polvo mediante liofilización. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es mezclado de forma conocida con las otras sustancias en estado de polvo, el cual es llenado en cápsulas de gelatina dura.

Ejemplo de referencia 19: supositorios de rViscumin 1 mg

20 250 supositorios para administración en el intestino

Un ejemplo para la preparación de supositorios de rViscumin se muestra a continuación:

Composición con ciclodextrina β -HP		
1.	rViscumin	1 mg
2.	Lecitina de soja	100 mg
3.	Tris-base	24 mg
4.	HCl (1 N)	para pH 8,0
5.	EDTA disódico	10 mg
6.	Ciclodextrina β -HP	160 mg
7.	Estearato sódico	50 mg
8.	Macrogol 300	250 mg
9.	Glicerol 85%	1,9 g
10.	Agua purificada	hasta 2,5 g

25 Las posiciones 1-6 fueron disueltas con agua purificada hasta 2 ml y se llevaron a estado de polvo mediante liofilización. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es elaborado de forma conocida con otras sustancias preparando supositorios. La mezcla del material en polvo de rViscumin disuelto en una mezcla de agua purificada y glicerina al 85% en la matriz de los supositorios, tiene lugar a una temperatura controlada. La masa es prensada para su conformación y se solidifica mediante enfriamiento.

30 Ejemplo de referencia 20: gel de rViscumin 1 mg

Gel hidrófilo para aplicación dérmica sin conservación

Un ejemplo de la preparación de un gel de rViscumin hidrófilo para aplicación dérmica se muestra a continuación:

Composición con ciclodextrina β -HP		
1. rViscumin	1 mg	
2. Poloxámero 166	100 mg	
3. Tris-base	24 mg	
4. HCl (1 N)	para pH 8,0	
5. EDTA disódico	10 mg	
6. Ciclodextrina β -HP	160 mg	
7. Monoestearato de sorbitan (Arlacel 60)	200 mg	
8. Estearato de macrogol 9	300 mg	
9. Glicerina 85%	500 mg	
10. Triglicérido de cadena media	500 mg	
11. Agua purificada	hasta 10 g	

5 Las posiciones 1-6 fueron disueltas en agua purificada hasta 2 ml mediante liofilización y preparadas en forma de polvo. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es elaborado de forma conocida con otras sustancias preparando geles. La mezcla del polvo de rViscumin disuelto en agua purificada en la matriz de gel tiene lugar por debajo de una temperatura de 30°C.

10 En caso necesario, puede tener lugar una conservación con benzoato sódico o ésteres de PHB.

Ejemplo21: polvo de rViscumin para inhalación 0,1/0,5 mg 1 g polvo

Composición con dextrano/celulosa		
1. rViscumin	0,1 mg	0,5 mg
2. Polysorbat 80	10 mg	10 mg
3. Tris-base	24 mg	24 mg
4. HCl (1 N)	para pH 8,0	para pH 8,0
5. Dextrano T1	100 mg	100 mg
6. Celulosa microcristalina	860 mg	860 mg
7. Carboximetilcelulosa sódica	5 mg	5 mg

15 Las posiciones 1-5 son disueltas con agua purificada hasta 2 ml y se llevan a estado de polvo mediante liofilización. Este material en polvo puede ser almacenado. El material en polvo es mezclado de forma conocida con las otras sustancias micronizado y administrado mediante inhaladores de polvo seco.

20 Ejemplo de referencia 22: influencia de los crioprotectores escogidos sobre la estabilidad de rViscumin

Preparados de rViscumin con la siguiente composición:

rViscumin	10 μ g
Tris-base	12,1 mg
Ácido clorhídrico 1N para ajuste de	pH a 8,0
Crioprotector	1/10 mg
EDTA sódico	10 μ g
Agua para inyección	hasta 1 ml

25 Se llenan en viales de congelación a 0,5 ml y se refrigeran en aparato de liofilización con una velocidad de enfriamiento 3 K/hora a -35°C. A continuación, se descongelan y la actividad de fijación de carbohidrato de rViscumin en la solución se determina de acuerdo con el método explicado en el ejemplo 4. Como crioprotectores se utilizaron Pluronic F68 y Polysorbat 80.

30 Después de la descongelación, se determinó una nueva cuantificación de la actividad de rViscumin en un rango de 98-102% para ambos crioprotectores en ambas concentraciones (figura 6).

35 Los dos crioprotectores Pluronic F68 y Polysorbat 80 son apropiados en un rango preferente, tal como se ha mostrado para ambas concentraciones de 0,1 a 1,0 % para estabilizar rViscumin durante la congelación en el proceso de liofilización.

Ejemplo de referencia 23: influencia de la concentración de proteína sobre la estabilidad en la liofilización

Preparaciones de rViscumin con la composición siguiente:

rViscumin	10/50/100 µg
Tris-base	12,1 mg
Ácido clorhídrico 1N para ajuste de	pH a 8,0
Polysorbat 80	1 mg
EDTA sódico	10 µg
Agua para inyección	hasta 1 ml

se llenaron a 0,5 ml en viales de congelación y se enfriaron en un aparato de liofilización con una velocidad de enfriamiento de 3 K/hora a -35°C y secados a continuación.

- 5 Programa de secado:
- Secado primario: 8 horas a -10°C y presión de 80 kPa seguido de aumento de temperatura a 10°C durante 8 horas y presión de 80 kPa,
- 10 Secado secundario: 6 horas a 30°C y presión de 10 kPa.

15 Las preparaciones escogidas con las diferentes concentraciones de rViscumin muestran con la exclusiva utilización del crioprotector Polysorbat 80, que es apropiado para la estabilización de rViscumin durante el proceso de descongelación, una estabilización insuficiente de la proteína después de la terminación del proceso de liofilización (figura 7). La estabilidad de rViscumin en el liofilizado depende de la elección de la concentración final de la solución acuosa, por lo tanto, aumenta la nueva determinación de la actividad de 50% para la concentración de 10 µg/ml a 80% para la concentración de 100 µg/ml. El ejemplo muestra claramente que en todas las concentraciones de rViscumin la añadidura de lioprotectores adecuados puede actuar de forma ventajosa sobre la estabilidad de las formas medicamentosas liofilizadas.

20 Ejemplo 24: influencia de manitol (Mannit) y dextrano sobre la estabilidad de rViscumin

La preparación de rViscumin (10 µg/ml) con la siguiente composición

Solución	Manitol	Manitol/Dextrano
rViscumin	10 µg	10 µg
Manitol	20 mg	20 mg
Dextrano T1		20 mg
Tris-Base	12,1 mg	12,1 mg
Ácido clorhídrico 1N para ajuste de	pH a 8,0	
Polysorbat 80	1 mg	1 mg
EDTA sódico	10 µg	10 µg
Agua para inyección	hasta 1 ml	hasta 1 ml

25 se llenan en viales de congelación a 0,5 ml y se enfrián en el aparato de liofilización con una velocidad de enfriamiento de 3K/hora a -35°C con secado final.

- 30 Programa de secado:
- Secado primario: 8 horas a -10°C y presión de 80 kPa seguido de aumento de temperatura a 10°C durante 8 horas y una presión de 80 kPa,
- 35 Secado secundario: 6 horas a 30°C y presión de 10kPa.
- Mediante la añadidura de una concentración subóptima de manitol de 2%, se determina una actividad para rViscumin de 61 % (figura 8). El manitol es apropiado para la estabilización de rViscumin puesto que permite aumentar la estabilidad de rViscumin en solución liofilizada 10 µg/ml de 50% a 61 %. Una mezcla de manitol a 2% y dextrano T1 2% muestra después de liofilización una actividad de 74%, con lo que se puede concluir que también el dextrano solo tiene una influencia positiva sobre la estabilidad.

40 Ejemplo 25: influencia de dextrano T1 sobre la estabilidad de rViscumin

Los preparados de rViscumin (10 µg/ml) con la siguiente composición

rViscumin	10 µg
Dextrano T1	0/8/20/40/80 mg
Tris-base	12,1 mg
Ácido nítrico (1N) para ajuste de	pH a 8,0
Polysorbat 80	1 mg
EDTA sódico	10 µg
Agua para inyección	hasta 1 ml

son llenadas a 0,5 ml en viales de congelación y enfriadas en un aparato de liofilización con una velocidad de enfriamiento de 3K/hora a -35°C, siendo secados finalmente.

5 Programa de secado:

Secado primario: 8 horas a -10°C y presión de 80 kPa seguido de aumento de temperatura a 10°C durante 8 horas y una presión de 80 kPa,

Secado secundario: 6 horas a 30°C y presión de 10kPa.

10 Para la concentración subóptima de 2% de dextrano T1, se vuelve a encontrar el 80% de la actividad de rViscumin. La estabilidad de rViscumin con dextrano se mejora sensiblemente en comparación con los resultados que se obtienen con utilización de la mezcla manitol/dextrano. Desde una concentración de dextrano superior/igual a 4% se conservan en el proceso de liofilización composiciones medicamentosas sólidas estables. El dextrano es apropiado como lioprotector para rViscumin.

15 Ejemplo 26: influencia de otros lioprotectores

Las composiciones de rViscumin (10 µg/ml) de la siguiente composición

rViscumin	10 µg
Lioprotector	80 mg con excepción de manitol 20 mg
Tris-base	12,1 mg
Ácido clorhídrico (1N) para ajuste de	pH a 8,0
Polysorbat 80	1 mg
EDTA sódico	10 µg
Agua para inyección	hasta 1 ml

20 se llenaron en viales de congelación de 0,5 ml y se enfriaron con una velocidad de enfriamiento de 3 K/hora a -35°C, siendo secados a continuación.

25 Programa de secado:

Secado primario: 8 horas a -10°C y presión de 80 kPa seguido de aumento de temperatura a 10°C durante 8 horas y una presión de 80 kPa,

Secado secundario: 6 horas a 30°C y presión de 10kPa.

30 La adecuación de preparados con los lioprotectores en concentraciones de 8% de hidroxietilo 450 (HES 450 8%), de 8% β-Hidroxipropil-ciclodextrina (β-HP-CD 8%) de 8% de hidroxietilo 130 (HES 130 8%), y 8% de dextrano T1 (TRIS 100 DEx T1 8%) y manitol en una concentración de 2% (wN) (Man 2%) es evidente. Los preparados indicados en primer lugar, muestran después de 8 horas a 60°C, una recuperación de rViscumin activo mayor de 60% mientras que la preparación con manitol en estas condiciones presenta una reducida estabilidad al estrés (figura 10).

35 De estos datos de estabilidad al estrés se pueden deducir las condiciones para la distribución de los medicamentos. Los medicamentos secos de rViscumin no deben ser transportados en una cadena de frío cerrada, tal como es necesario para las preparaciones acuosas.

40 Ejemplo 27: estabilidad de almacenamiento comparativa de solución de rViscumin y rViscumin en polvo

La preparación de rViscumin (1 µg/ml) con la siguiente composición:

rViscumin	10 µg
Dextrano T10	80 mg
Tris-base	12,1 mg
Ácido clorhídrico (1N) para ajuste de	pH a 8,0
Polysorbat 80	1 mg
EDTA sódico	10 µg
Agua para inyección	hasta 1 ml

45 se llena en viales de congelación de 0,5 ml y se enfriá en un aparato de liofilización con una velocidad de enfriamiento de 3K/segundo a -35°C secándose a continuación.

50 Programa de secado:

Secado primario: 8 horas a -10°C y presión de 80 kPa seguido de aumento de temperatura a 10°C durante 8 horas y una presión de 80 kPa,

Secado secundario: 6 horas a 30°C y presión de 10kPa.

Los viales son almacenados a continuación en condiciones controladas a 2-8°C.

- 5 La preparación de rViscumin (1 µg/ml) con la siguiente composición:

rViscumin	1 µg
Fosfato monohidrogenado sódico dihidratado	17,8 mg
Fosfato dihidrogenado sódico dihidratado	3,13 mg
Cloruro sódico	37,5 mg
Polivodona K 17	1 mg
EDTA sódico	1 mg
Agua para inyección	hasta 1 ml

10 es llenada en ampollas de vidrio y almacenada en condiciones controladas a 2-8°C. Esta composición es comparable con las composiciones farmacéuticas acuosas de rViscumin descritas en el documento EP 0 751 221 B1.

15 rViscumin muestra en forma de material en polvo liofilizado después de un tiempo de almacenamiento de 52 semanas una actividad sin variación. No se detecta pérdida alguna de actividad. La preparación acuosa correspondiente del estado de la técnica muestra actividad solamente después de un corto periodo de tiempo de almacenamiento y tiene, después de 6 semanas de almacenamiento, solamente 70% de actividad (figura 11). Se muestra la notable superioridad de la composición liofilizada. Por estos datos, se puede concluir que es posible el almacenamiento durante tiempos prolongados de un año del material en polvo de las formas medicamentosas de rViscumin, mientras que la preparación acuosa, que fue formulada de acuerdo con un estado de la técnica, presenta solamente un corto periodo de duración.

20 Los ejemplos anteriores explican la invención descrita.

Referencias

- 25 Allison SD, Chang BS, Randolph TW, Carpenter JF. Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding. *Arch Biochem Biophys.*, 1999; 365 (2): 289 - 299.
- 30 Allison SD, Manning MC, Randolph TW, Middleton K, Davis A, Carpenter JF. Optimization of Storage Stability of Lyophilized Actin Using Combinations of Disaccharides and Dextran. *J Pharm Sci.*, 2000; 89 (2) 199 - 214.
- 35 Bocci V; Mistletoe (*viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1993; 7(1): 1-6.
- 40 Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Pulverer G.; Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In Vivo*, 1991; 5(1): 29-32.
- 45 Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Burrichter H, Oette K, Pulverer G.; Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin Investig.*, 1992; 70(8): 658-61.
- 50 Beuth J, Ko HL, Tunggal L, Geisel J, Pulverer G.; [Comparative studies on the immunoactive action of galactoside-specific mistletoe lectin. Pure substance compared to the standardized extract]. *Arzneimittelforschung.*, 1993a; 43(2):166-9. Lengua alemana.
- 55 Carpenter JF, Prestrelinski SJ, Arakawa T.; Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilisation: I. Enzyme Activity and Calorimetric Studies. *Arch Biochem Biophys.*, 1993; 2: 456 - 464.
- 50 Carpenter JK, Izutsu K; Freezing- and Drying-Induced Perturbations of Protein Structure and Mechanism of Protein Protection by Stabilizing Additives. en Rey L, May JC (eds); *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. New York, Basel: Marcel Dekker Inc. 1999: 123 - 160.
- 55 Dulat HJ, von Grumbkow C, Baars W, Schroder N, Wonigeit K, Schwinzer R; Downregulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. *Eur J Immunol.*, 2001; 31 (7): 2217-26

- Endo Y, Tsurugi K, Lambert JM.; The site of action of six different ribosome-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1988; 150 (3): 1032-6.
- 5 Endo Y, Oka T, Tsurugi K, Franz H.; The mechanism of action of the cytotoxic lectin from *Phoradendron californicum*: the RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett.*, 1989; 248(1-2): 115-8.
- Franz H, Haustein B, Luther P, Kuropka U, Kindt A.; Isolation and characterization of mistletoe extracts (*Viscum album* L.). I. Affinity chromatography of mistletoe extracts on immobilized plasma proteins. *Acta Biol Med Ger.*, 1977, 10 36(1): 113-7.
- Gabius HJ, Walzel H, Joshi SS, Kruip J, Kojima S, Gerke V, Kratzin H, Gabius S.; The immunomodulatory beta-galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells. *Anticancer Res.*, 1992; 12(3): 669-75.
- 15 Gabius HJ, Gabius S, Joshi SS, Koch B, Schroeder M, Manzke WM, Westerhausen M.; From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: will there be a reason for oncological application of mistletoe? *Planta Med.*, 1994; 60(1): 2-7.
- 20 Gabius HJ und Gabius S; Die Misteltherapie auf dem naturwissenschaftlichen Prüfstand. *PZ.*, 1994; 139, 9-16.
- Ganguly C and Das S.; Plant lectins as inhibitors of tumour growth and modulators of host immune response. *Chemotherapy*, 1994; 40(4): 272-8.
- 25 Gerhardt, P, Murray, RGE, Wood, WA, Krieg, NR, (1994) "Methods for General and Moleculat Bacteriology", American Society for Microbiology.
- Gloer O., Müller B.W.; Influence of freezing on the pH-shift of different buffer systems. *Proceedings 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology* 2000, 967-968.
- 30 Hajto T. Immunomodulatory effects of iscador: a *Viscum album* preparation. *Oncology*, 1986; 43 Suppl 1: 51-65.
- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res.*, 1989; 49(17): 4803-8.
- 35 Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ.; Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.*, 1990; 50(11): 3322-6.
- 40 Hajto, T, Hostanska, K, (2001); EP 0 602 686 B1.
- Heiny BM, Beuth J.; Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces beta-endorphin release and immunopotentiation in breast cancer patients. *Anticancer Res.*, 1994; 14(3B): 1339-42.
- 45 Lentzen, H, Eck, J, Baur, A, Zinke, H, (1998); EP 0 751 221 B1.
- Mannel DN, Becker H, Gundt A, Kist A, Franz H.; Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunol Immunother.*, 1991; 33(3): 177-82.
- 50 Matzinger P; The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods.*, 1991; 145(1-2): 185-92.
- Old, RW and Primrose, SB; (1992) "Gentechnologie, Eine Einführung" Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- 55 Paques, EP; (1994) EP 0 430 200 B1.
- Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJ.; Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.*, 2001; 15(9): 1493-506
- 60 Sambrook y otros, (1989) "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"; second edition, CSH Press, Cold Spring Harbor.
- Woog, H, Gruber, W, Markl, HJ, Demmer, F. (1992), EP 0 306 824 B1.
- 65 Woog, H, Gruber, W, Markl, HJ, Winter, G, Demmer, F. (1996), EP 0 607 156 B1.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la fabricación de un medicamento que contiene un polipéptido, que comprende, como mínimo, un polipéptido recombinante que fija el carbohidrato de una cadena B de una proteína que inactiva los ribosomas o un fragmento funcional de ésta, en el que
- 10 a) el polipéptido o un fragmento funcional de este polipéptido es fusionado con un péptido que actúa de forma citotóxica, formando una proteína de fusión;
- b) el polipéptido o un fragmento funcional de este polipéptido es unido a otro polipéptido que posee una actividad enzimática rARN-N-glicosidasa;
- 15 c) el polipéptido o un fragmento funcional de este polipéptido está unido a otro polipéptido, en el que una actividad enzimática rARN-N-glicosidasa ha sido sustituida por otra actividad citotóxica; o
- 20 d) el polipéptido o un fragmento funcional de este polipéptido es unido a una proteína de fusión, comprendiendo un polipéptido con una actividad enzimática rARN-N-glicosidasa y/u otra actividad citotóxica, en una forma estable en almacenamiento de larga duración y comprendiendo además un portador farmacéuticamente aceptable;
- 25 que comprende una etapa de enfriamiento, congelación, secado por pulverización o secado por liofilización, manteniendo las características farmacológicas del polipéptido en la solución, en el que la solución se caracteriza porque el valor del pH de la solución es superior a pH 6,0 y un sistema de tampón que contiene un disolvente que garantiza el mantenimiento de este valor de pH, en el que, mediante un secado por liofilización, se añade, como mínimo, un lioprotector a la solución, en un rango de concentración final de 4% a 10%, en el que el lioprotector consiste en dextrano/dextranos.
- 30 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el otro polipéptido que está unido al polipéptido recombinante que fija el carbohidrato, es la cadena A de una proteína que inactiva los ribosomas.
- 35 3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la proteína que inactiva los ribosomas es una proteína que inactiva los ribosomas de tipo II.
- 40 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la proteína que inactiva los ribosomas es de tipo II rViscumin.
- 5 5. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el valor del pH de la solución varía entre 6,0 y 9,0.
- 45 6. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el valor del pH de la solución varía entre 7,5 y 8,5.
7. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la sal o sales del sistema de tampón se encuentran en un rango de concentración final de 5 mM a 200 mM.
- 50 8. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la sal o sales del sistema de tampón se encuentran en un rango de concentración final de 100 mM a 200 mM.
9. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la sal o sales de tampón son seleccionadas entre un grupo que comprende: TRIS/HCl, TRICIN/HCl, HEPES/HCl, un tampón de amoniaco carbonato, un ácido TRIS/glutámico y un ácido TRIS/aspártico.
- 55 10. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que para estabilizar las características farmacológicas del polipéptido, la solución contiene una o varias sustancias tensoactivas.
11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que las sustancias tensoactivas son agentes tensoactivos no iónicos, utilizados en un rango de concentración final de 0,01% a 5,0%.
- 60 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que los agentes tensoactivos son seleccionados entre el grupo que comprende: alcoholes grasos, glicéridos parciales, Polysorbats, ésteres de ácidos grasos polioxietilénicos y éteres de ácidos grasos polioxietilénicos, poloxámeros (copolímeros bloque polioxipropileno-polioxietileno), ésteres de ácido graso de sacáridos, ésteres de ácido graso polioxiglicerólicos y fosfátidos.
- 65 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que los polisorbatos son seleccionados entre un grupo que comprende Polysorbat 80, Polysorbat 20 y un éter de sorbitol de polioxietileno.

14. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que los éteres de ácido graso polioxetilénicos y los ésteres de ácido graso polioxetilénicos son éteres de macrogol y ésteres de macrogol.
- 5 15. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que el poloxámero es plurónico F68, poloxámero 166 o poloxámero 188.
16. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que los fosfátidos son lecitina.
- 10 17. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que las sustancias tensoactivas son agentes tensoactivos anfóteros y son utilizados en un rango de concentración final de 0,01% a 5,0%.
- 15 18. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 17, en el que para un secado por liofilización, se añade dextrano o dextranos a la solución en un rango de concentración final de 4% a 10%, así como crioprotectores, en un rango de concentración final de 0,01% a 1,0%.
19. Procedimiento, según la reivindicación 18, en el que el dextrano o dextranos son añadidos en un rango de concentración final de 4,0 a 10%, así como crioprotectores, en un rango de concentración final de 0,05 a 0,1%.
- 20 20. Procedimiento, según la reivindicación 18 ó 19, en el que se utilizan sustancias iónicas como crioprotectores.
21. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que las sustancias iónicas son seleccionadas entre un grupo que comprende cloruro sódico, sulfato sódico, cloruro potásico y sulfato potásico.
- 25 22. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 18 a 21, en el que los lioprotectores y los crioprotectores forman estructuras amorfas durante el secado por liofilización.
23. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 22, en el que los estabilizadores son aminoácidos utilizados en un rango de concentración final de 0,01 a 50 mg/ml.
- 30 24. Procedimiento, según la reivindicación 23, en el que los aminoácidos son seleccionados entre el grupo que comprende aminoácidos, tales como ácido glutámico y ácido aspártico, aminoácido básico llamado arginina y aminoácido neutro llamado valina.
- 35 25. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 24, en el que el polipéptido de una cadena B de una proteína que inactiva los ribosomas, que comprende, como mínimo, un polipéptido recombinante que fija carbohidratos o un fragmento funcional de este polipéptido es utilizado en un rango de concentración final de 10 ng/ml a 10 mg/ml.
- 40 26. Procedimiento, según la reivindicación 25, en el que el polipéptido es utilizado en un rango de concentración final de 100 ng/ml a 1 mg/ml.
27. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 26, que comprende además la preparación consecutiva o la reconstitución del medicamento como solución acuosa o no acuosa.
- 45 28. Procedimiento, según la reivindicación 27, en el que el medicamento es preparado en forma de solución a inyectar, a instilar o a infundir.
29. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 26, que comprende además la preparación consecutiva o la reconstitución del medicamento para uso gastrointestinal, oral, nasal, pulmonar, dérmico, transdérmico o local.
- 50 30. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 27, que comprende además la preparación consecutiva del medicamento bajo forma de un jarabe, cápsulas, tabletas, supositorios o gel.
31. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 26, que comprende además la preparación consecutiva del medicamento en forma de un material en polvo a inhalar que puede ser administrado en un inhalador.
- 55 32. Medicamento fabricado según el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 31.

Figura 1

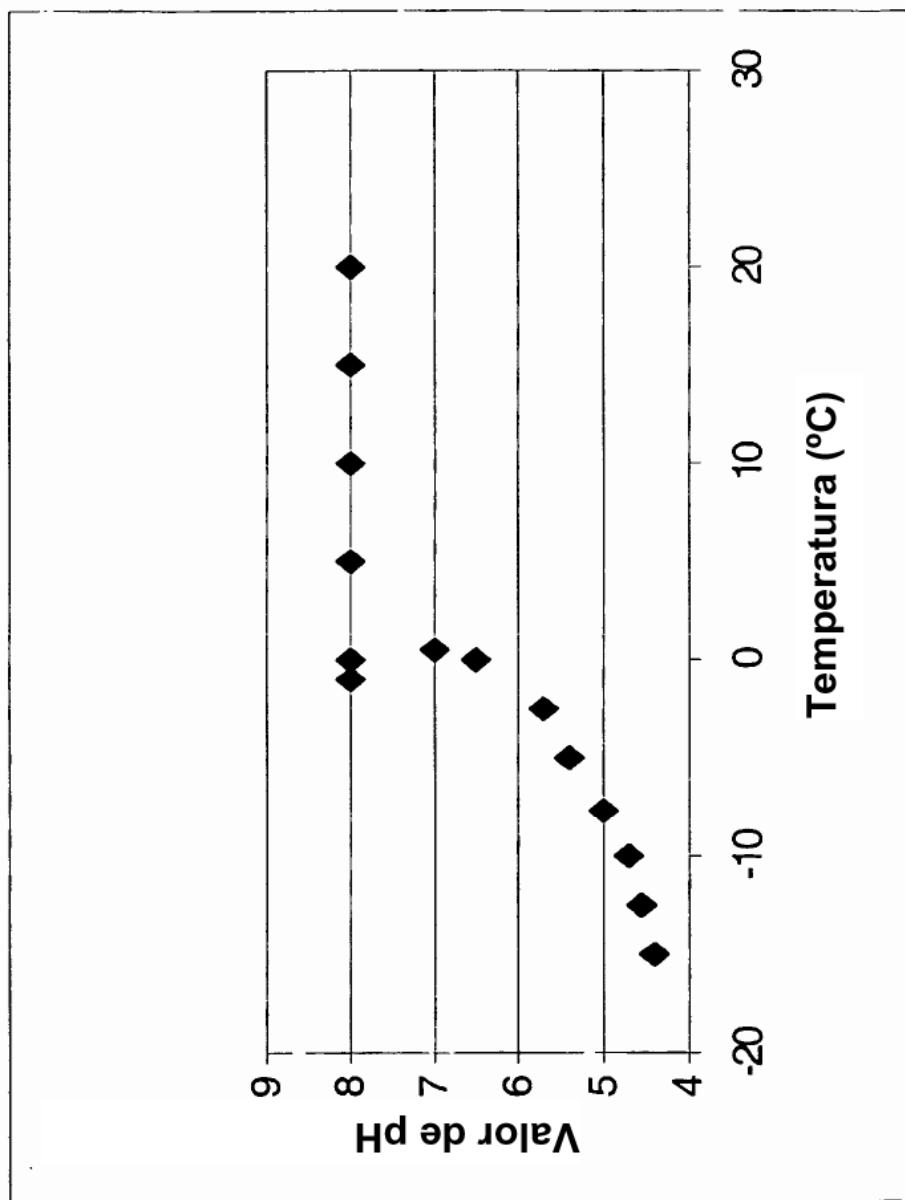


Figura 2

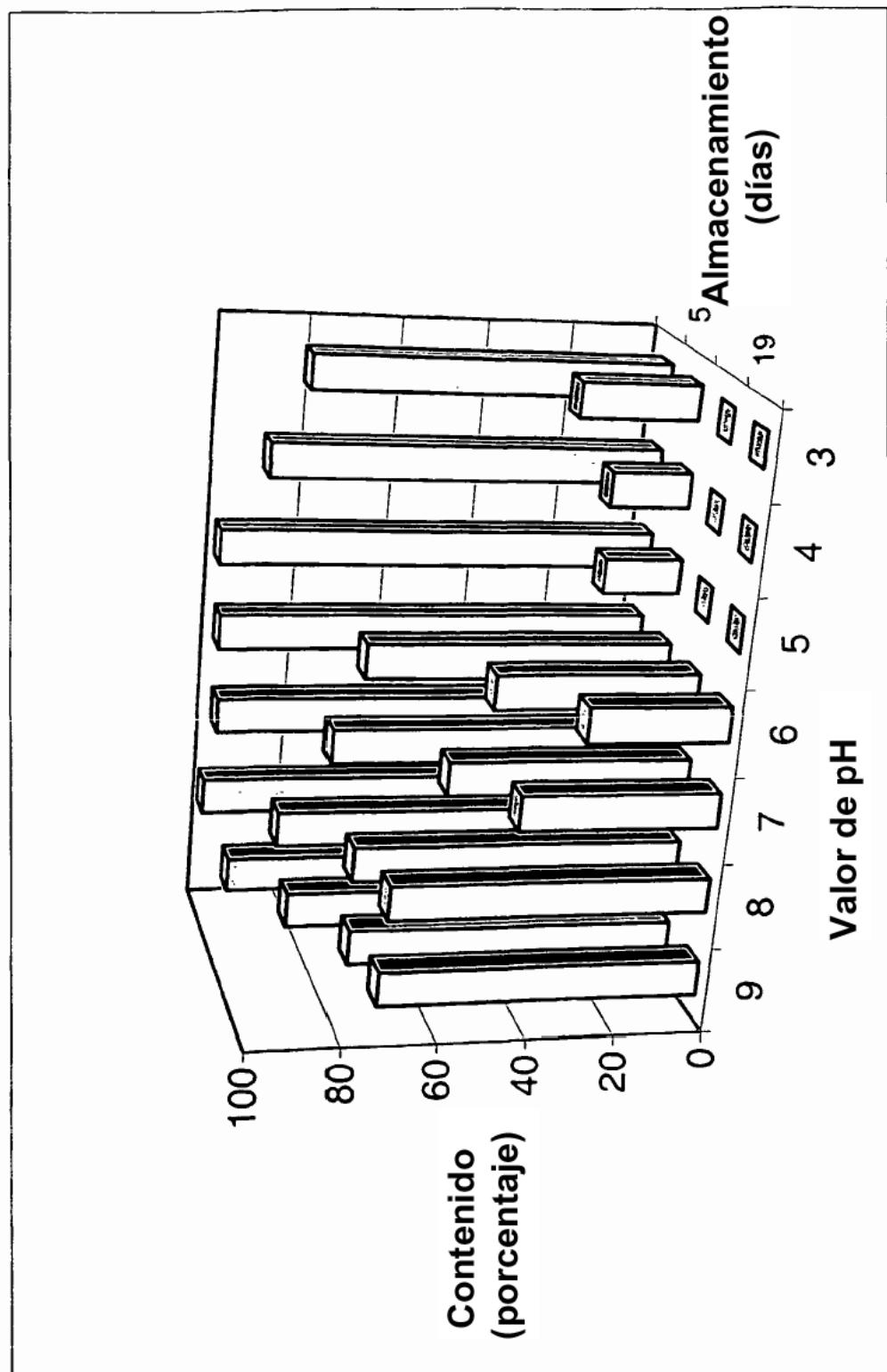


Figura 3

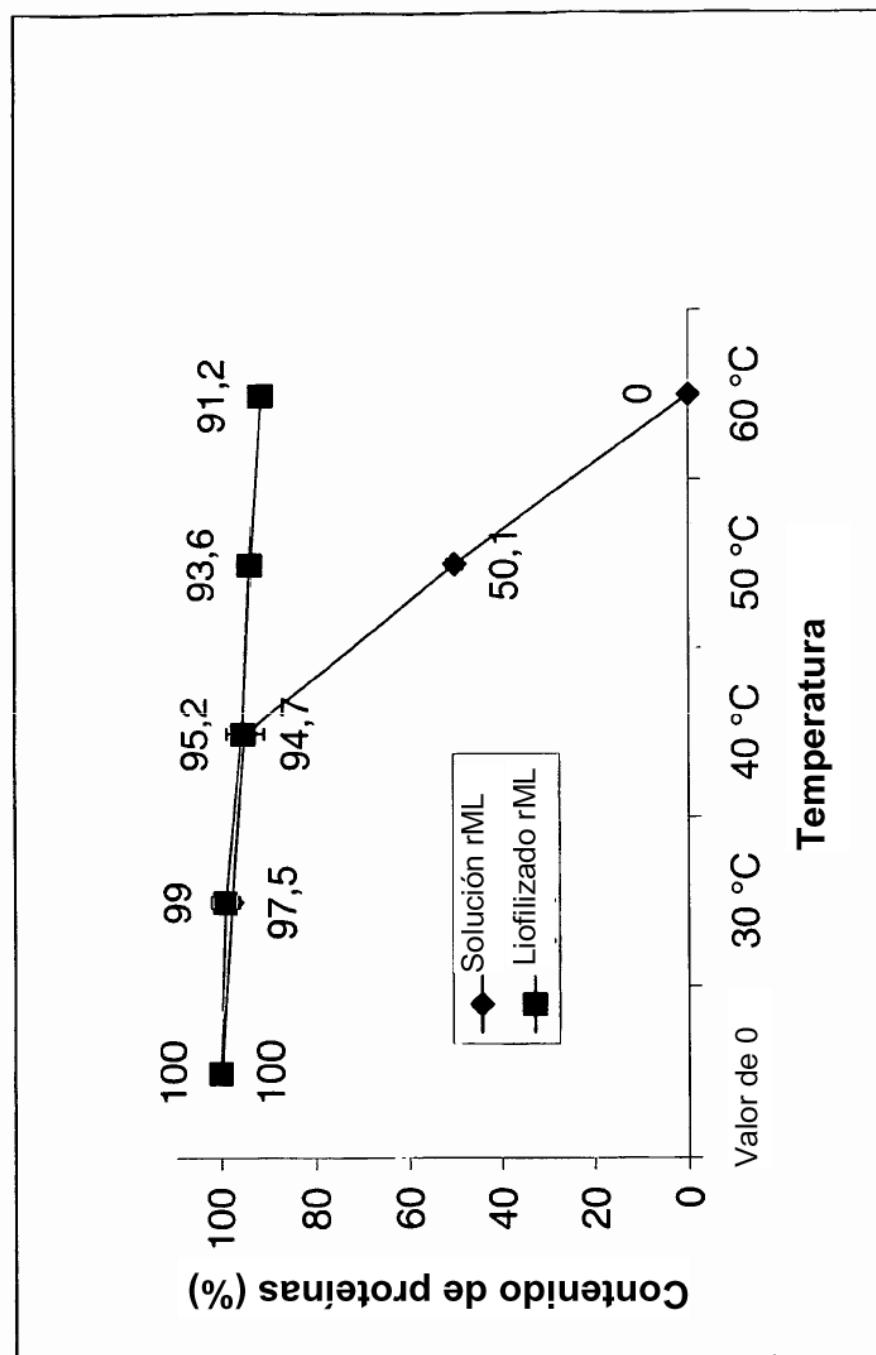


Figura 4

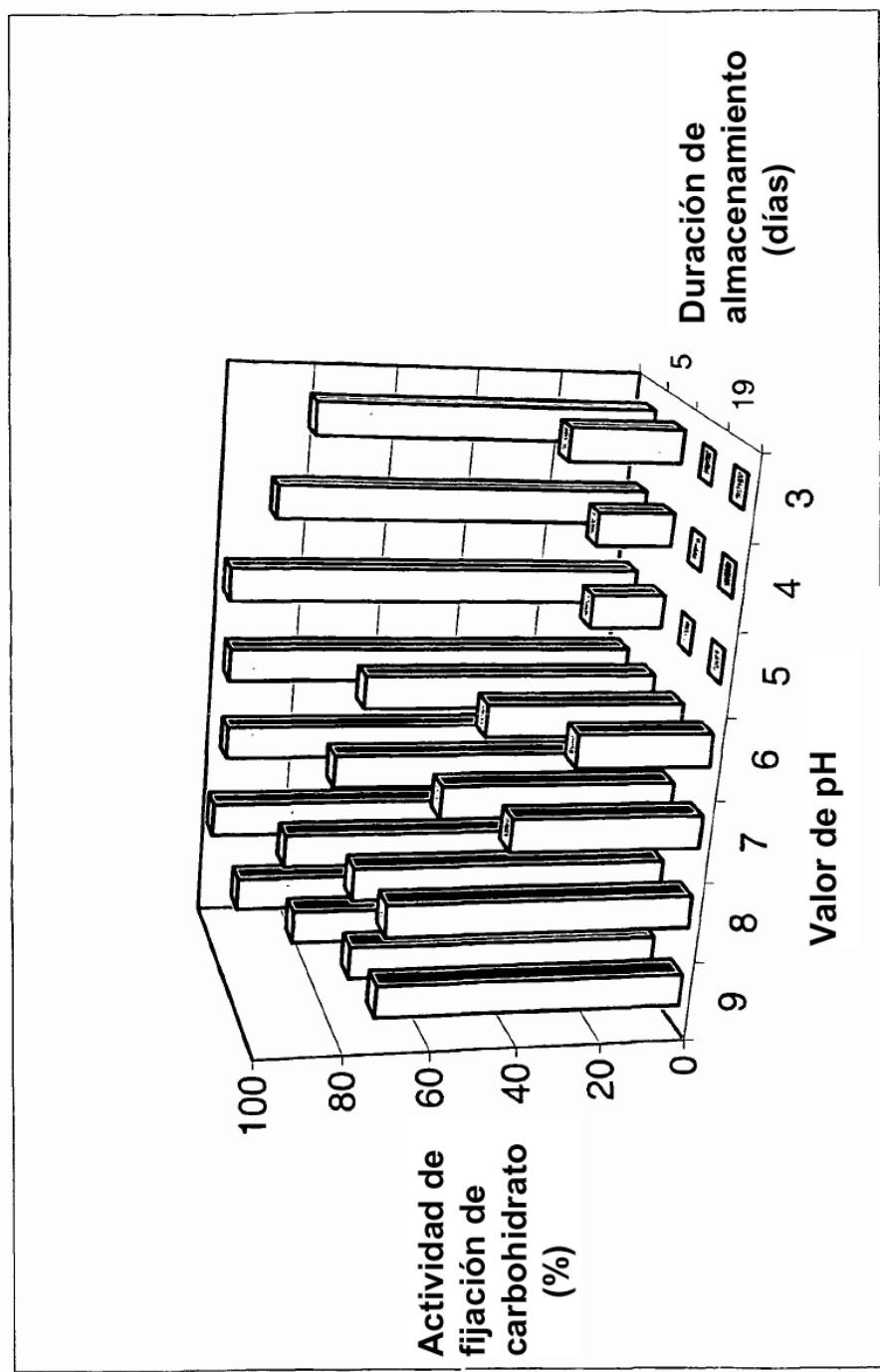


Figura 5

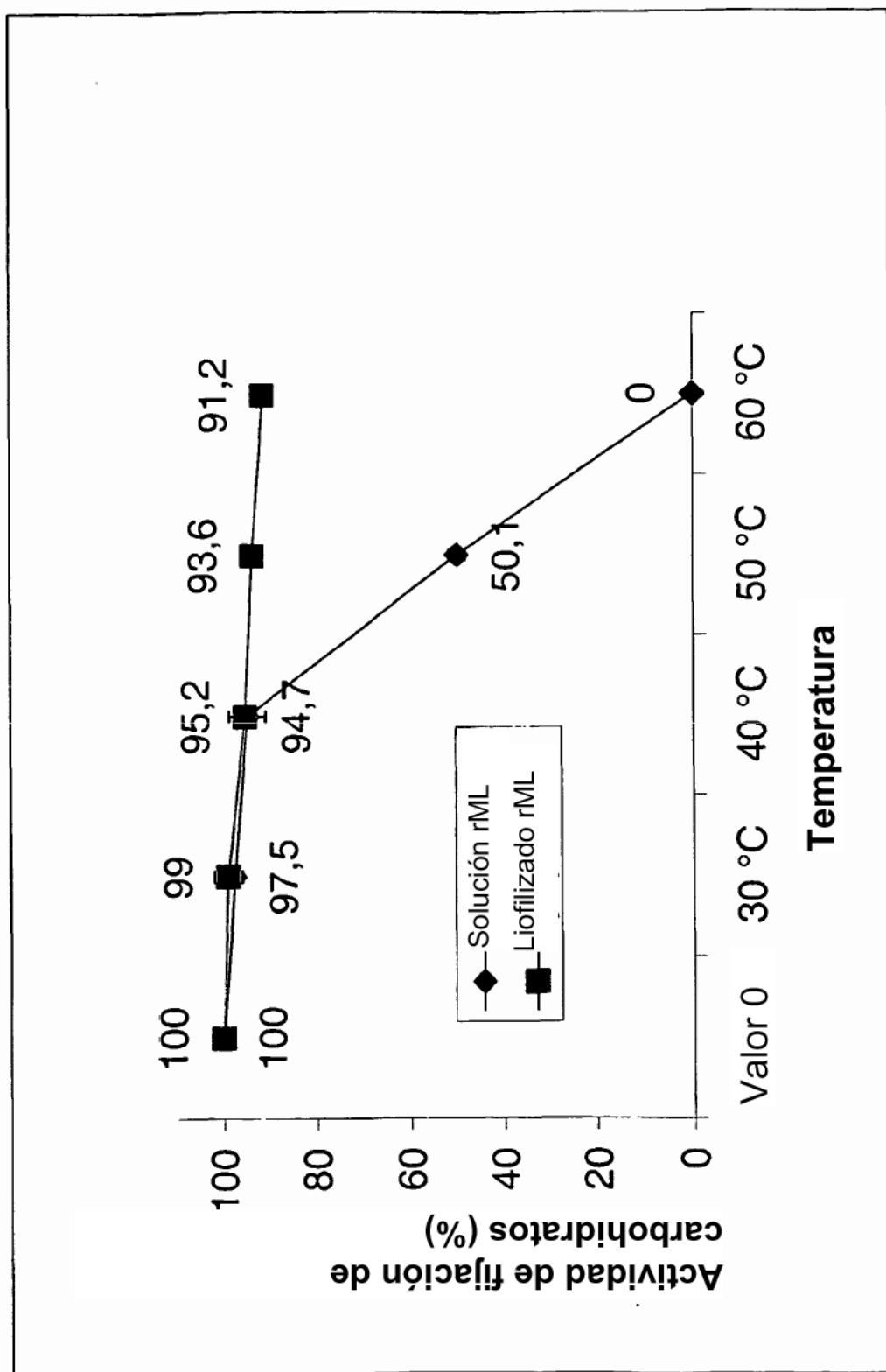
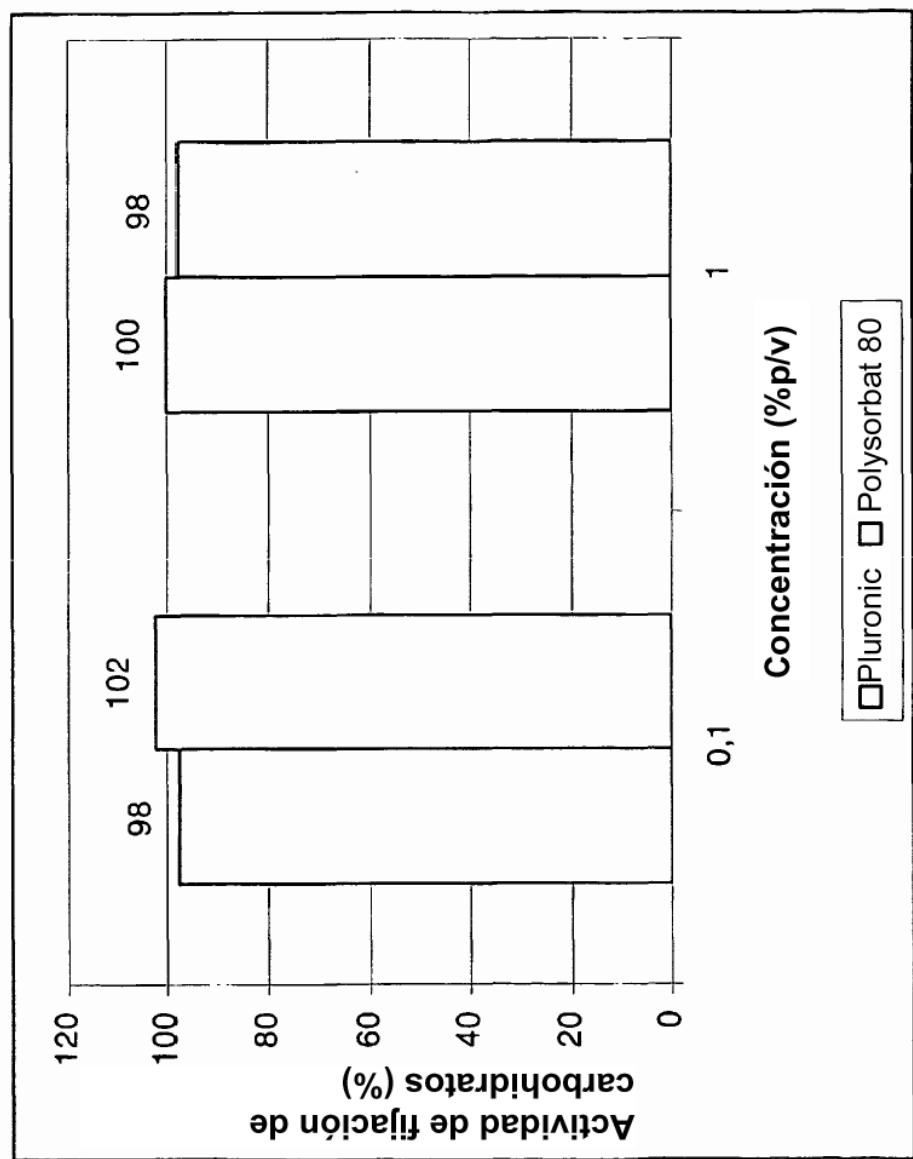


Figura 6



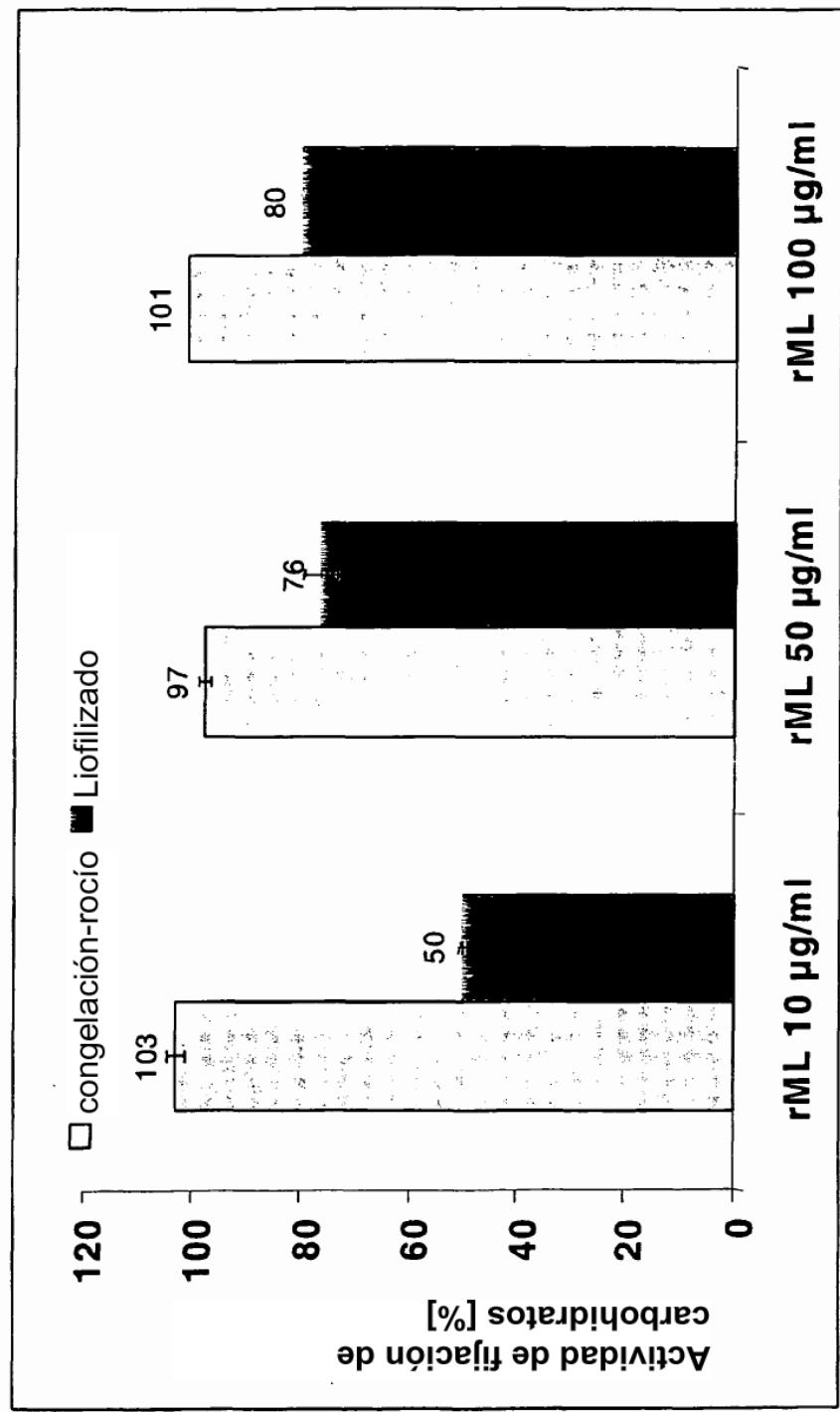


Figura 7

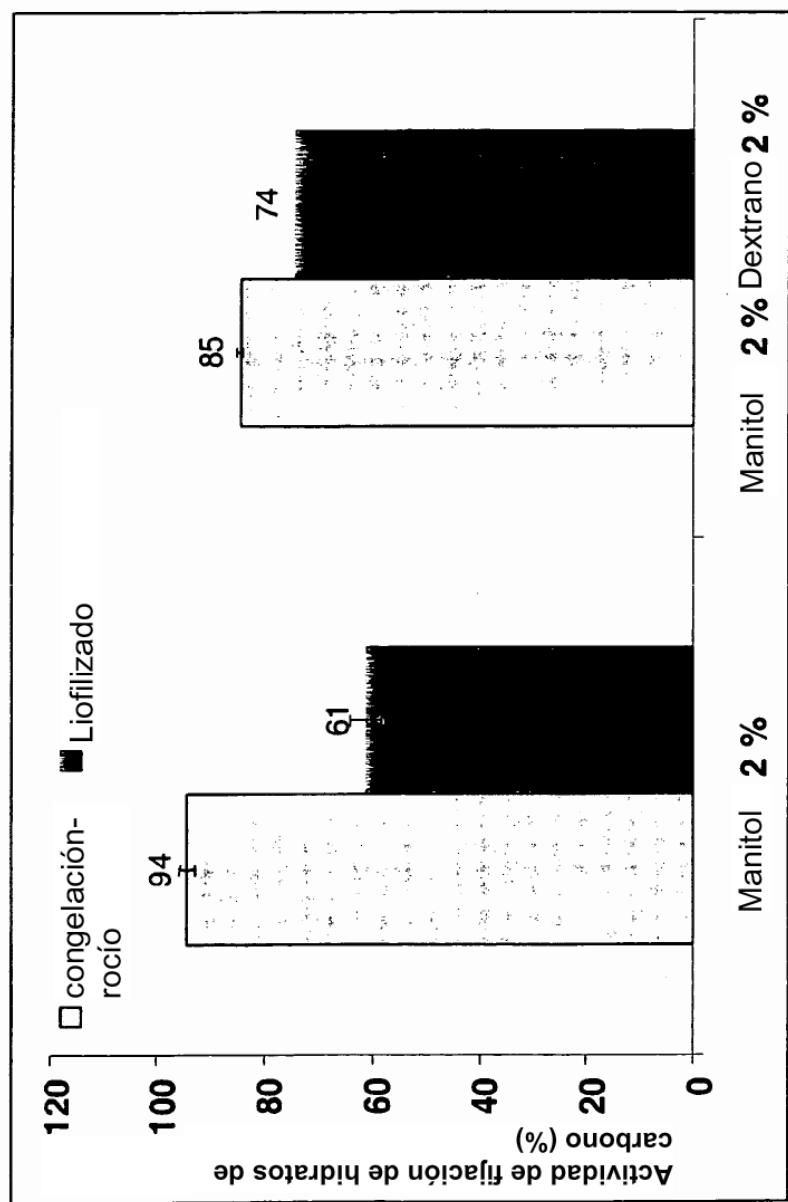


Figura 8

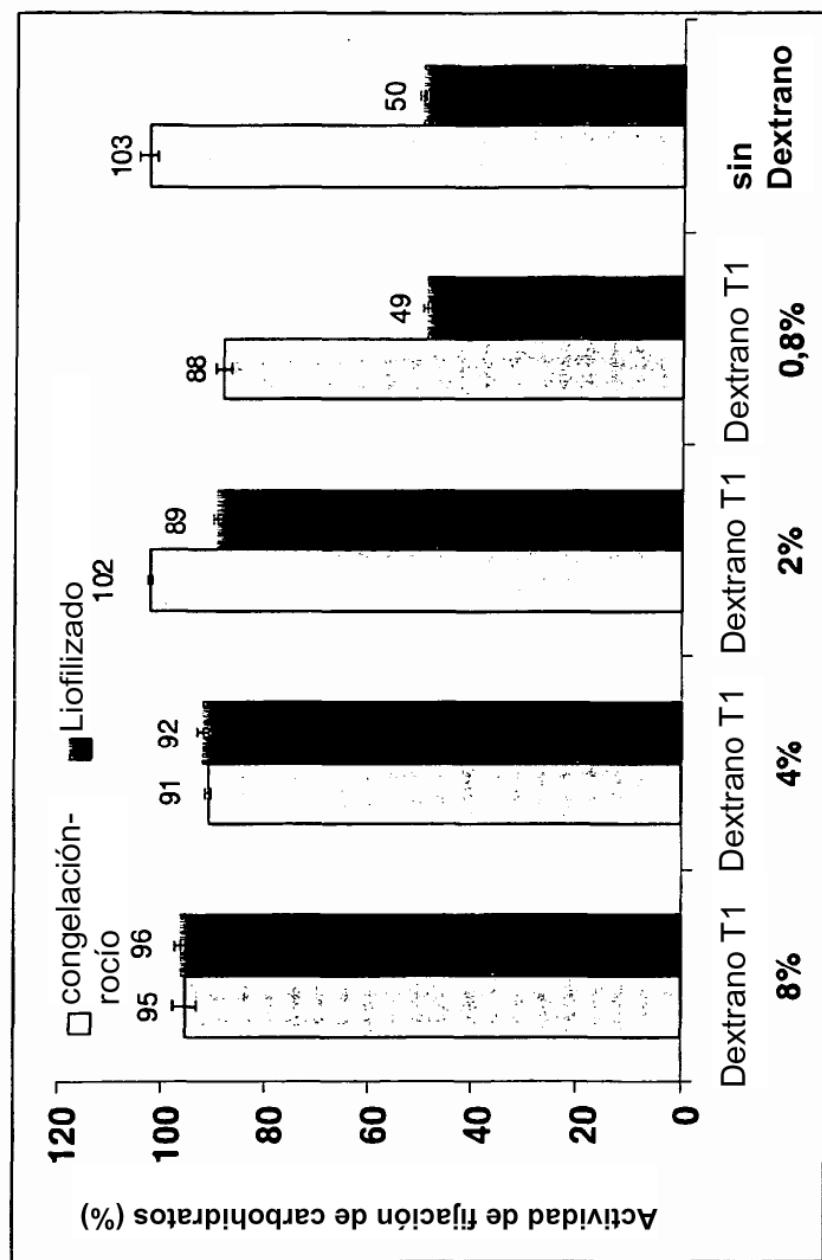


Figura 9

Figura 10

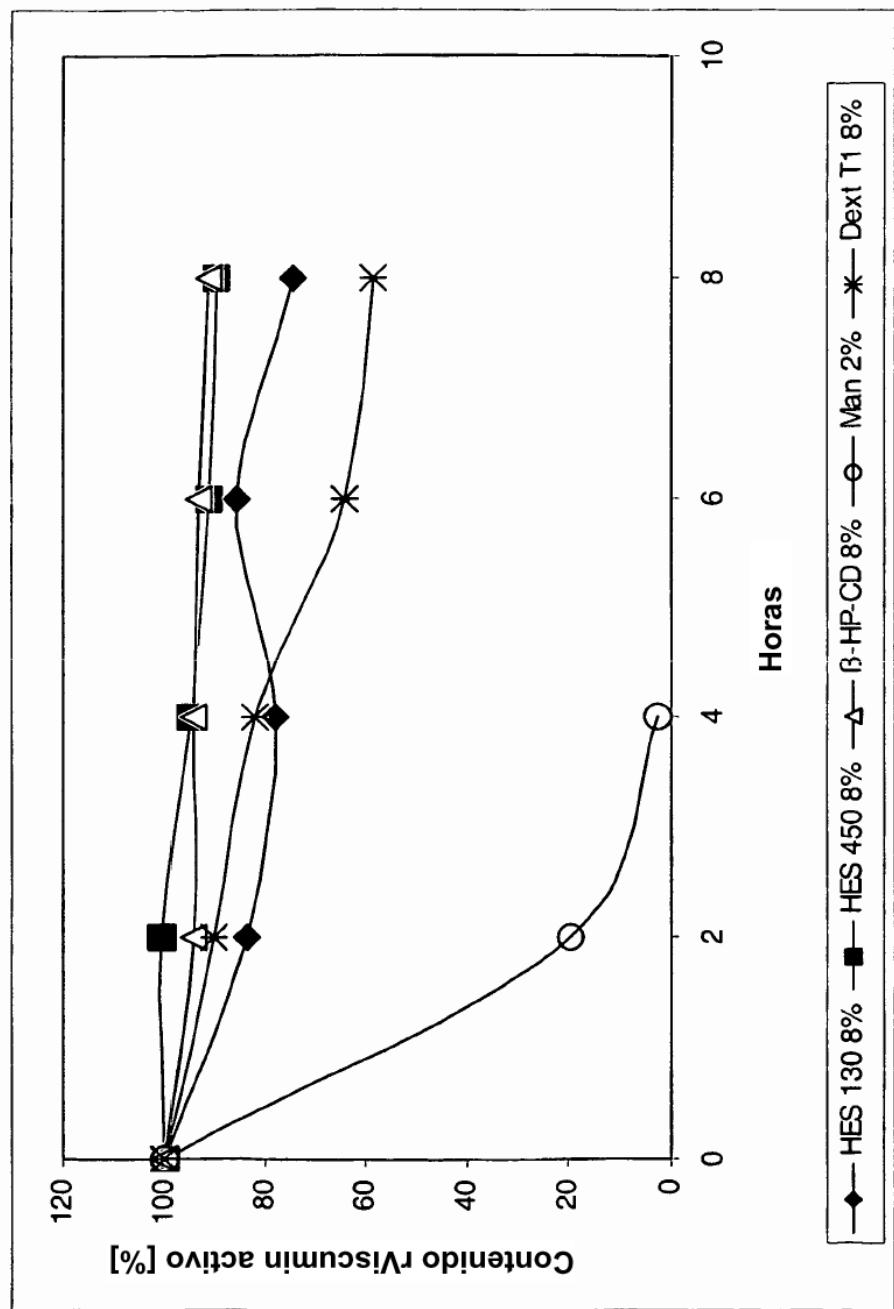


Figura 11

