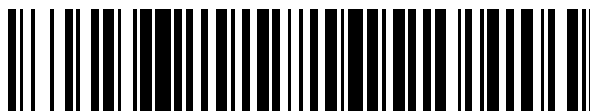


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

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

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

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

30 Prioridad:

05.10.2001 DE 10149030

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

29.10.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 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 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 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 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 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 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 terapéuticos podían 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
10 carbohidratos. La actividad biológica se correlaciona con el mantenimiento de la actividad de la lectina de la cadena B (Hajto y otros, 1990).

La utilización de una forma medicamentosa o bien de un preparado de medicamento con rViscumín como
15 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
20 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
25 tiempos de almacenamiento de menos de 10 semanas (2,5 meses) en condiciones de almacenamiento de 2-8°C (nevera).

El problema que subyace técnicamente en la presente invención era, por lo tanto, la preparación de un
30 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.

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

Como consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un medicamento que
40 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.

45 Polipéptidos recombinantes y proteínas se pueden manifestar partiendo de los genes clonados correspondientes con utilización de métodos de biología molecular convencionales. Éstos se han descrito entre otros en el manual "Gentechnologie" (Old y Primrose, 1992) o en los manuales de laboratorio "Methods for General and Molecular Bacteriology" (Gerhardt y otros, Chapter 18) o bien "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook y otros, 1993).

50 De acuerdo con la invención, un "polipéptido que fija carbohidratos" es un polipéptido que tiene la propiedad de unirse específicamente a carbohidratos determinados. Son ejemplos de estos carbohidratos la galactosa, N-Acetil-Galactosamina, galactosa modificada, ácido neuramínico, sacáridos de bajo peso molecular y oligosacáridos con galactosa final y/o unidades de galactosa finales o bien unidades de galactosa modificadas o unidades de ácido
55 neuramínico finales y péptidos y líquidos con correspondiente función de carbohidrato. De acuerdo con la invención, "fragmentos funcionales o derivados de este polipéptido" se caracterizan por el hecho de que éstos presentan especificidad para la unión a los carbohidratos antes indicados.

60 La utilización de polipéptidos, según la invención, tales como, por ejemplo, rViscumín y otros polipéptidos dímeros de las plantas de la clase II de las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP II) para la fabricación de medicamentos de alta efectividad, se ha descrito entre otros en el documento EP 0 751 221 B1. Estos medicamentos han sido administrados, preferentemente, después de un año de la fabricación.

65 Un medicamento o preparado medicamentoso actúa en el sentido de la invención como estable en almacenamiento cuando se puede almacenar durante un largo periodo de tiempo, es decir, de varios meses o, como mínimo, seis meses, sin observar variación significativa de las propiedades específicas del preparado medicamentoso y del

- 5 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 significativa 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.
- 10 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 previsible 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.
- 20 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.
- 30 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.
- 45 En el estado de la técnica se describen múltiples medicamentos que contienen soluciones tamponadas compuestas de bajo peso molecular, compuestos oligómeros (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.
- 60 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

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;

(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

(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.

25 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 fisicoquímico. 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.

30 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", "Propidiumlodid-Färbung von Zellen" o bien "Annexin-V Test" ver Dulat (2001)).

35 Son ejemplos para péptidos con actividad enzimática rARN-glicosidasa de proteínas inactivadores de ribosomas (RIP), entre otros, los trabajos de Endo y otros (1988 y 1989) y un artículo de resumen de Peumans y otros (2001).

40 En otra forma preferente de realización del procedimiento, el polipéptido que fija carbohidratos, recombinante, es la cadena B de una proteína inactivadora de ribosomas.

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.

45 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.

50 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 modificarían 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 mM (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 rViscumín 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 rViscumín 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 dextranos 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 dextranos 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 dextranos

5 pueden ser utilizados también solos de manera preferente sin otros lioprotectores en el procedimiento de la invención. La adecuación individual de los dextranos 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 edítico. 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 0,00001% (10ng/ml) a 1,0% (10mg/ml). Es especialmente preferente una concentración de proteínas de 0,00001% (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.

Es además preferente la formulación del medicamento como jarabe, cápsulas, tabletas, supositorios o geles.

45 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 extensibles.

50 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.

Igualmente, la invención se refiere a la utilización de un polipéptido para la fabricación de dicho medicamento.

60 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.

65

En las figuras,

5 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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

45 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

50 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

55 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.

60 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.

65 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 (Quadrate) 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 rViscumín 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 rViscumín.

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, TRISIN/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 rViscumín específico de carbohidratos con dependencia del valor de pH y tiempo reducido de almacenamiento

15 Se disuelve rViscumín 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 µm) 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 monoclonado 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.

30 La investigación mostrada en la figura 2 muestra que la estabilidad del polipéptido rViscumín 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 rViscumín con actividad de lectina en las soluciones. La estabilidad más elevada de rViscumín, con mantenimiento de la actividad de lectina, se observa para valores de pH elevados.

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

35 El rViscumín está disuelto en una concentración de 2,0 µg/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 µm, 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.

45 Después 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:

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 rViscumín 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 rViscumín con actividad de lectina. Después de que la solución ha sido calentada a 60°C, no se puede encontrar contenido alguno de rViscumín con actividad de lectina. La temperatura de descomposición de rViscumín en solución se debe estimar, por lo tanto, entre 40°C y 50°C. El contenido de rViscumín 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 rViscumín con

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

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

5 100 µl de una solución de 0,1 mg/ml de asialofetúina 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 rViscumín 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-rViscumín) 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.

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

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

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 rViscumín 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	
rViscumín	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

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	
rViscumín	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

En el último ejemplo para este grupo de compuestos de rViscumín se describe además la preparación de una solución de inyección de rViscumín 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	
rViscumín	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-hidroxiopropil-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

5 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 µm. La solución es llenada en frascos de vidrio en condiciones asépticas. El medicamento es estable en las condiciones de almacenamiento de 2-8°C.

10 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 µg/ml (liofilizado) que contiene glucosa

15 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

20 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 µm. 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.

25 Ejemplo de referencia 12: solución de rViscumin que contiene sorbitol 10 µg/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

30 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 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.

35

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

Composición con sorbitol y NaCl	
rViscumín	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 rViscumín 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 rViscumín que contiene aerosil 100 µg/ml (liofilizado)

Composición con dióxido de silicio	
rViscumín	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 rViscumín 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 rViscumín que contiene povidona 10 µg/ml (liofilizado)

Composición con polivinilpirrolidona y NaCl	
rViscumín	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 rViscumín 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: rViscumín en polvo para la preparación de una solución, solución de rViscumín 10 mg para toma oral

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

ES 2 427 140 T3

Composición con dextrano	
1. rViscumín	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.

10

Composición con sacarosa (sucrosa)	
1. rViscumín	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. Agua	hasta 100 ml

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

15

Se describe a continuación un ejemplo para la preparación de rViscumín 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. rViscumín	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. Después de mantenimiento del tiempo de espera, el jarabe está en condiciones de administración.

25

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

Tabletas de 250 mg para administración oral

30

Se muestran a continuación ejemplos de preparación de tabletas de rViscumín:

Composición con dextrano/celulosa		
1. rViscumín	0,1 mg	0,5 mg
2. Lecitina de soja	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	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

- 5 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 µg
Tris-base	12,1 mg
Ácido clorhídrico 1N para ajuste de	pH a 8,0
Crioprotector	1/10 mg
EDTA sódico	10 µg
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 enfrían 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,
- Secado secundario: 6 horas a 30°C y presión de 10kPa.

35 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 rViscumín. La estabilidad de rViscumín 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 rViscumín.

15 Ejemplo 26: influencia de otros lioprotectores

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

rViscumín	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

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 rViscumín 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 rViscumín 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 rViscumín y rViscumín en polvo

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

rViscumín	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 enfría en un aparato de liofilización con una velocidad de enfriamiento de 3K/segundo a -35°C secándose a continuación.

Programa de secado:

50 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.

Bocci V; Mistletoe (*viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1993; 7(1): 1-6.

35 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.

40 Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Burcher 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.

45 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.

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, Hausteil 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, Kruij 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 Molecular Bacteriology", American Society for Microbiology.
- Gloger 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 immunopotentialiation 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
- 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;
- 20 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.
- 25
- 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.
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.
- 35 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la proteína que inactiva los ribosomas es de tipo II rViscumin.
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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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 amoníaco 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.
- 60 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%.
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 polisorbats 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 polioxietilénicos y los ésteres de ácido graso polioxietilénicos 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%.
- 20 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.
- 30 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.

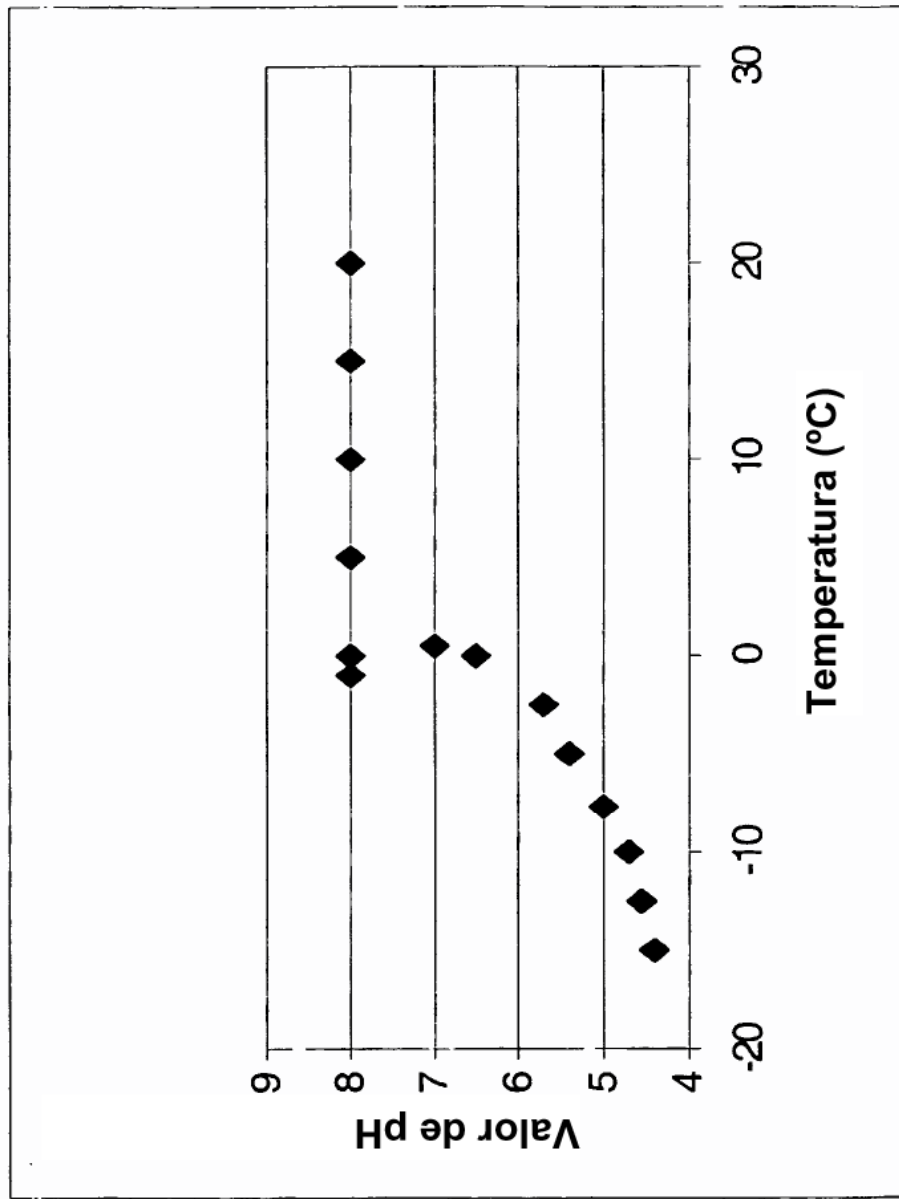


Figura 1

Figura 2

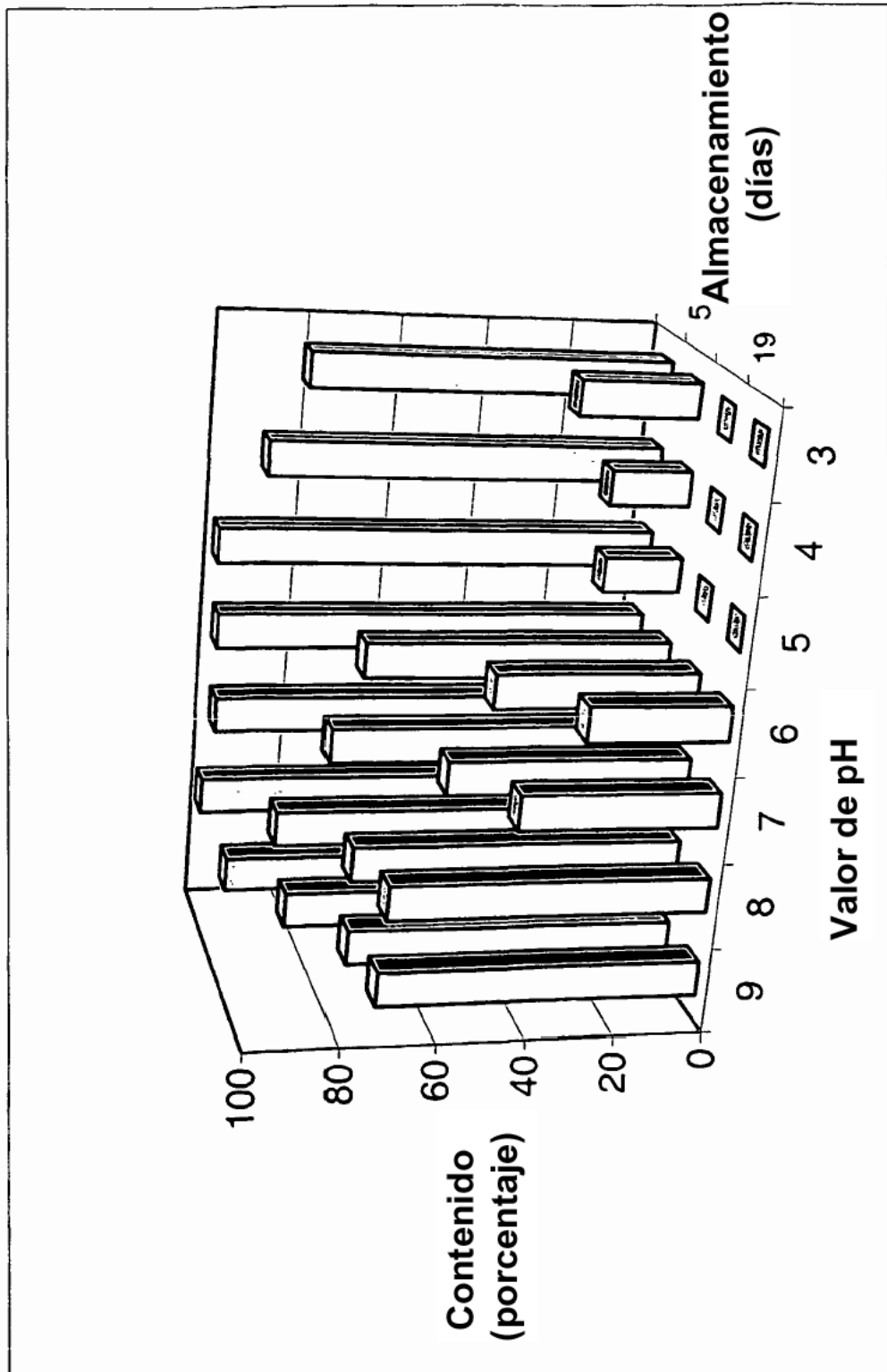


Figura 3

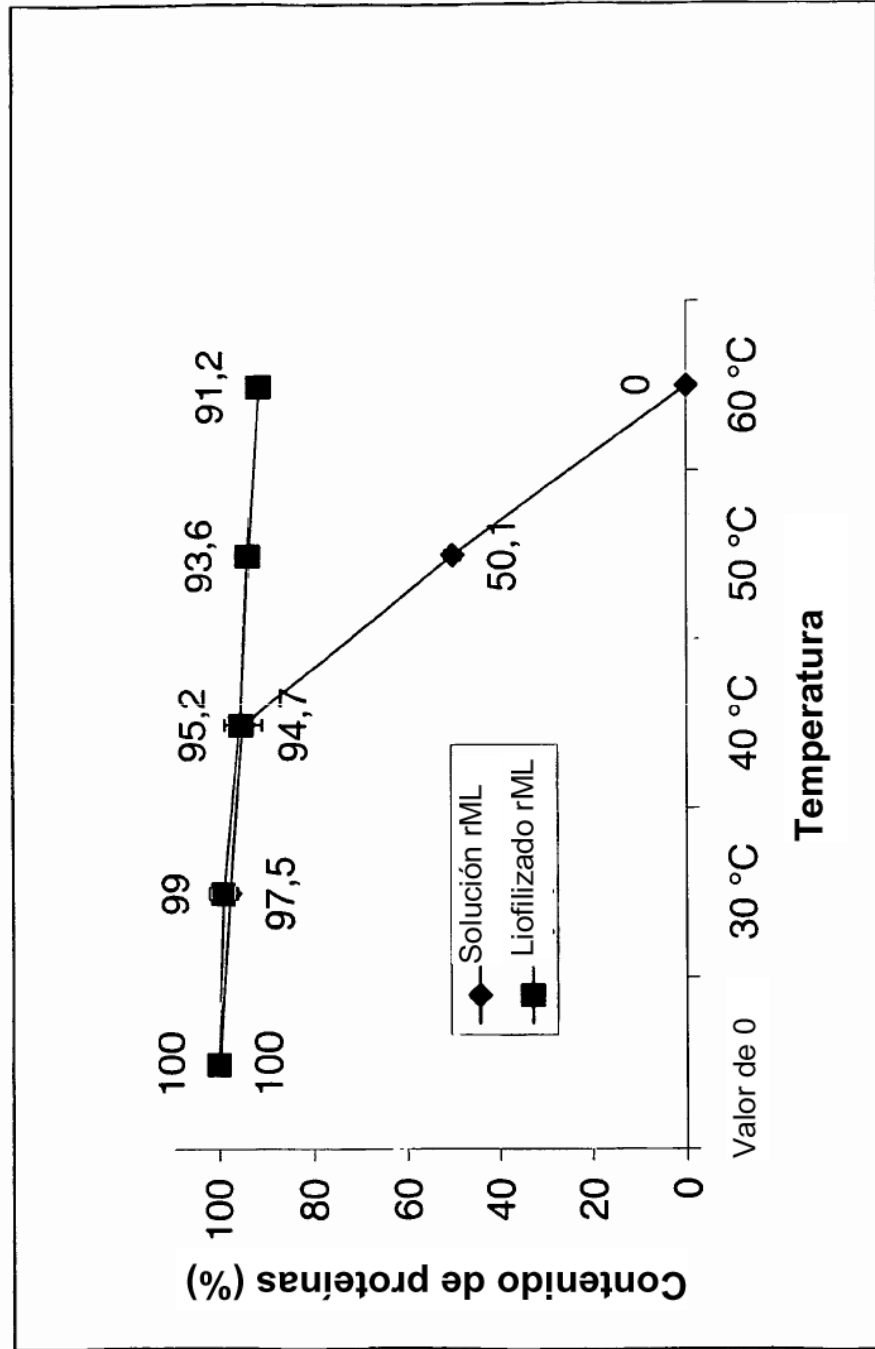


Figura 4

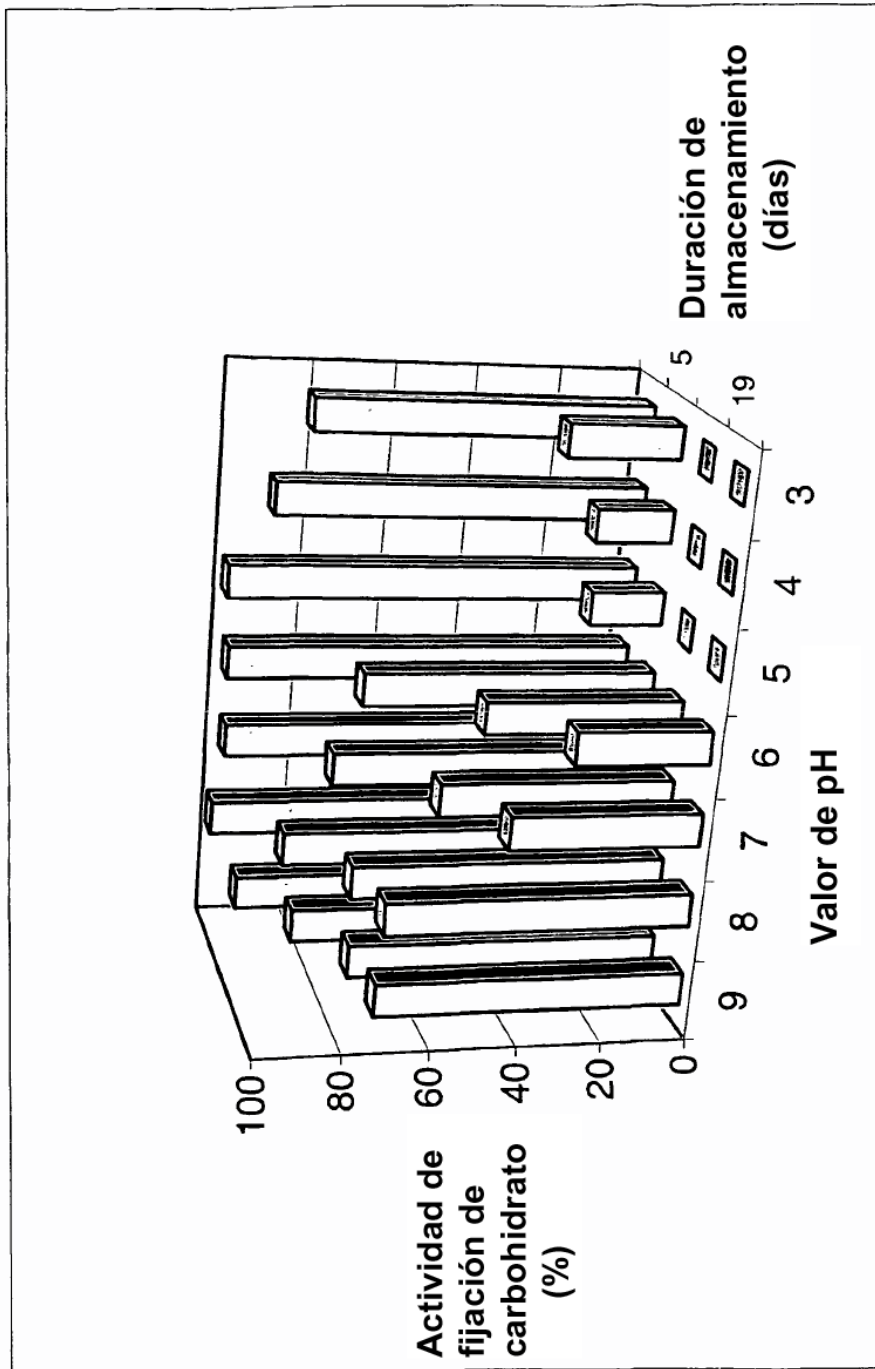


Figura 5

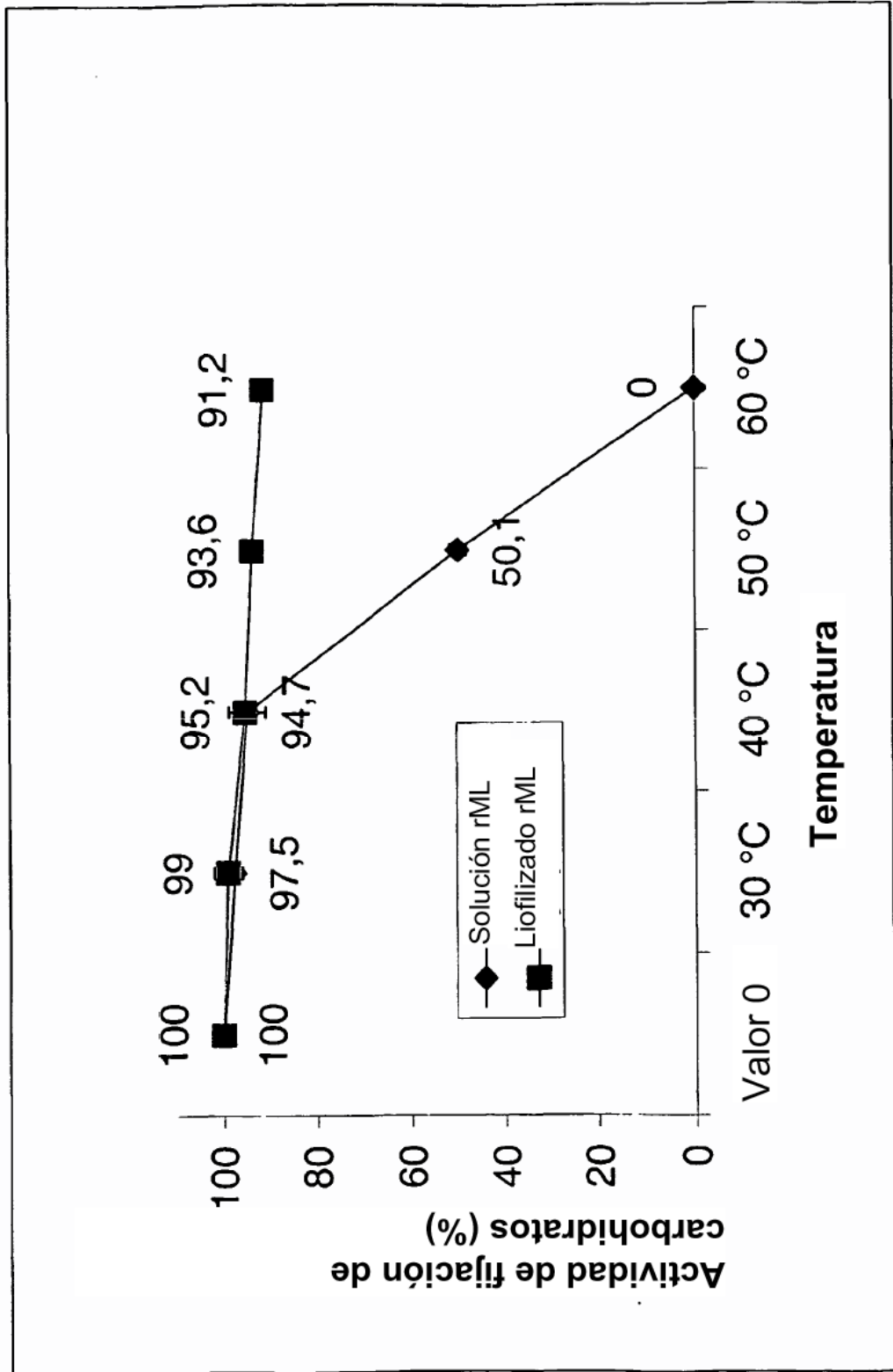
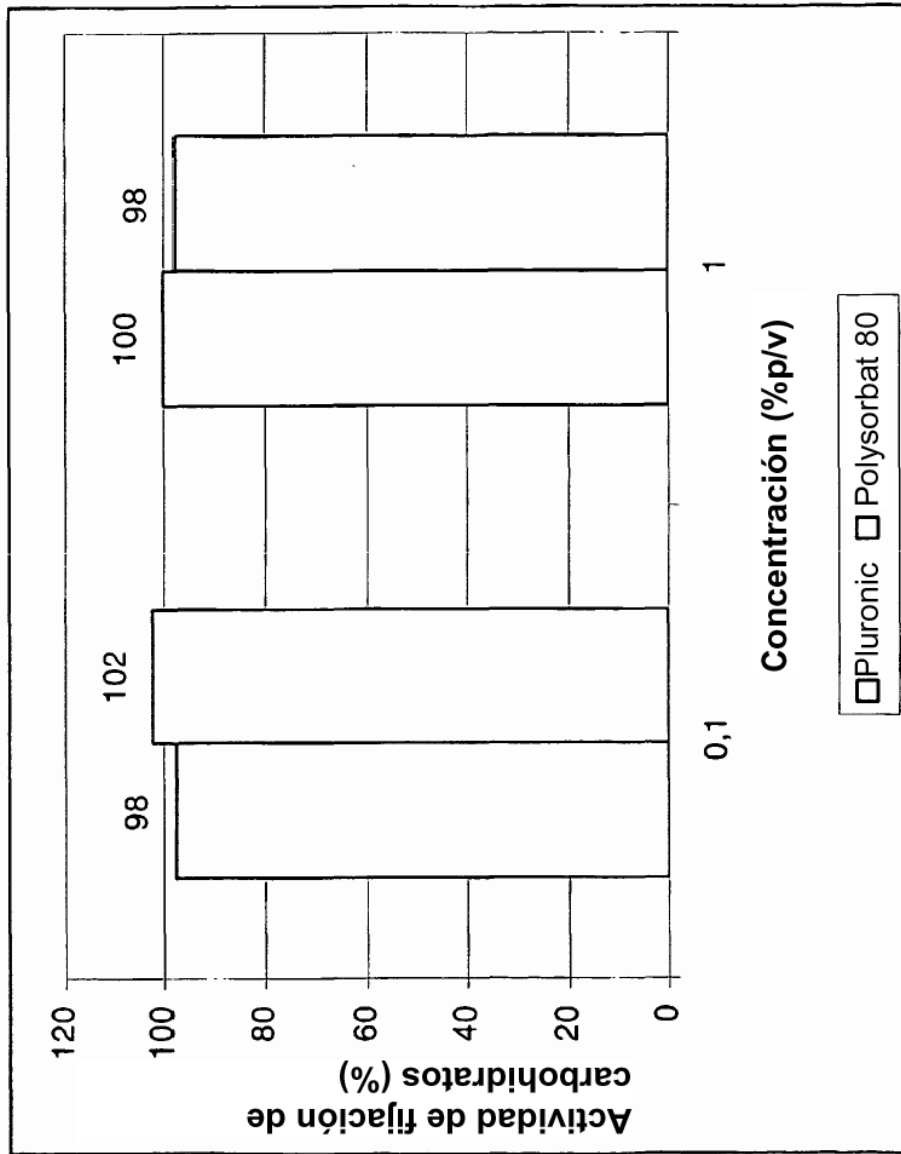


Figura 6



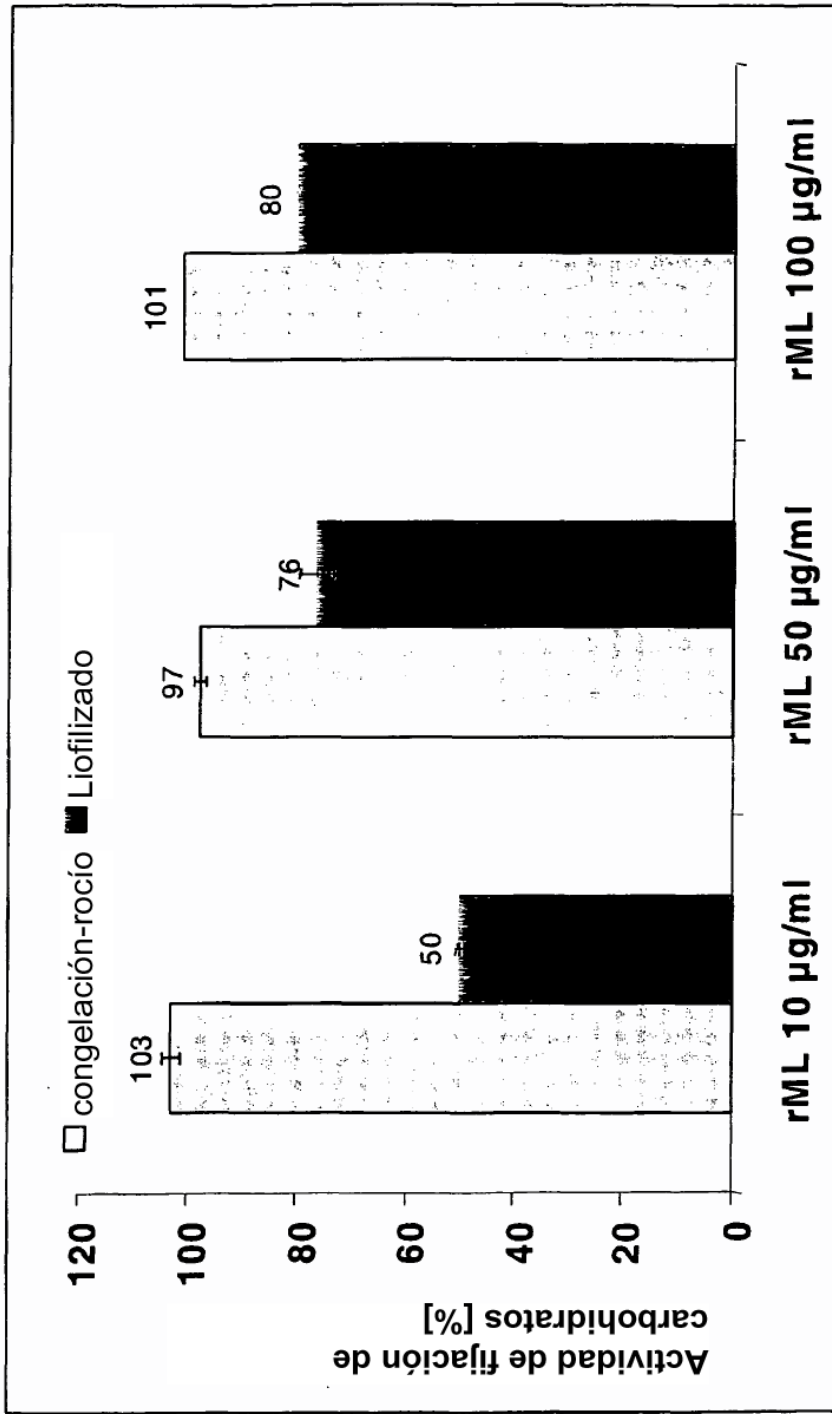


Figura 7

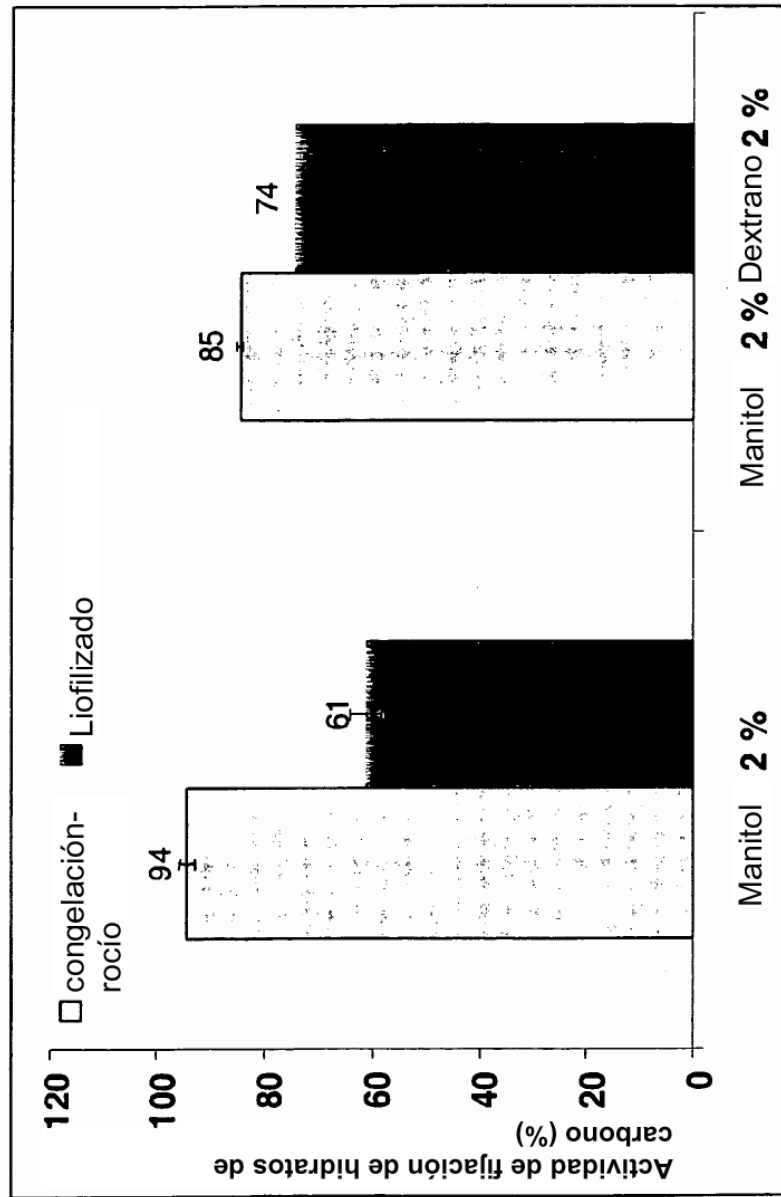


Figura 8

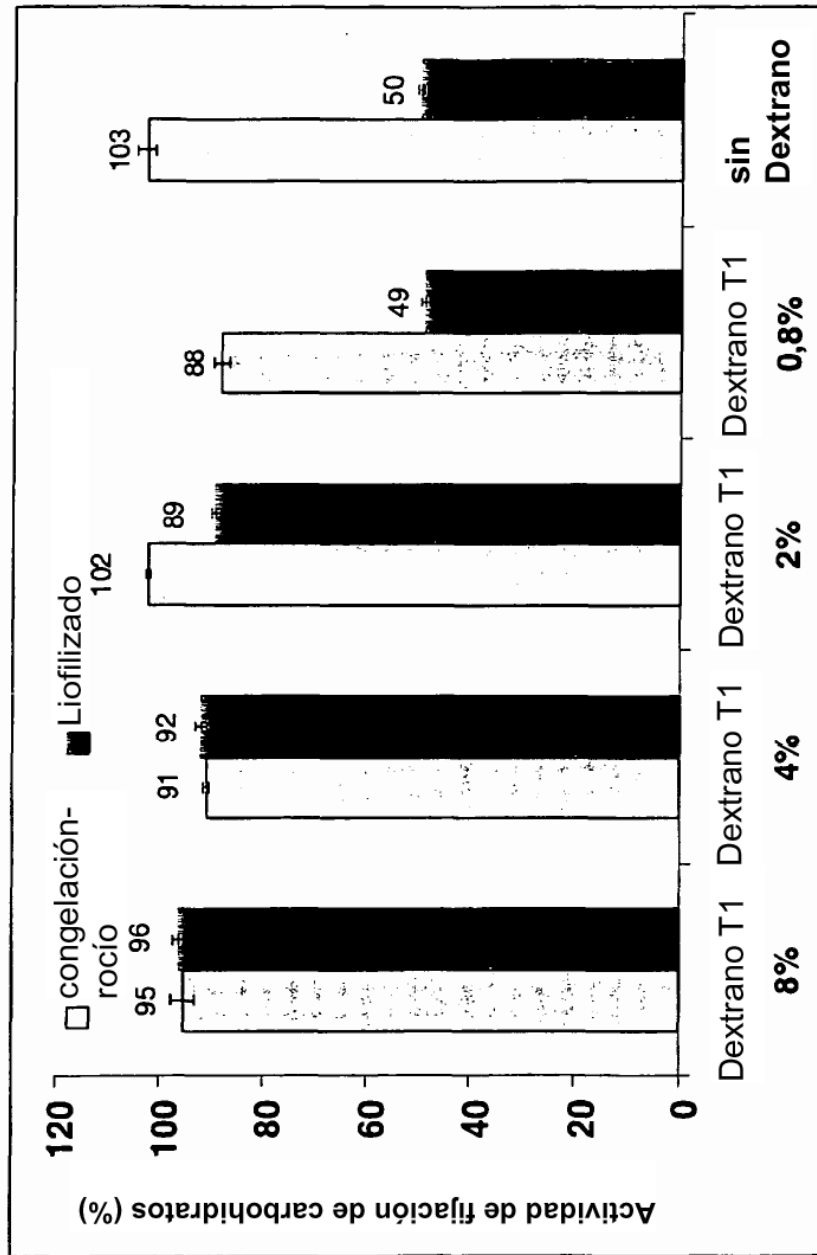
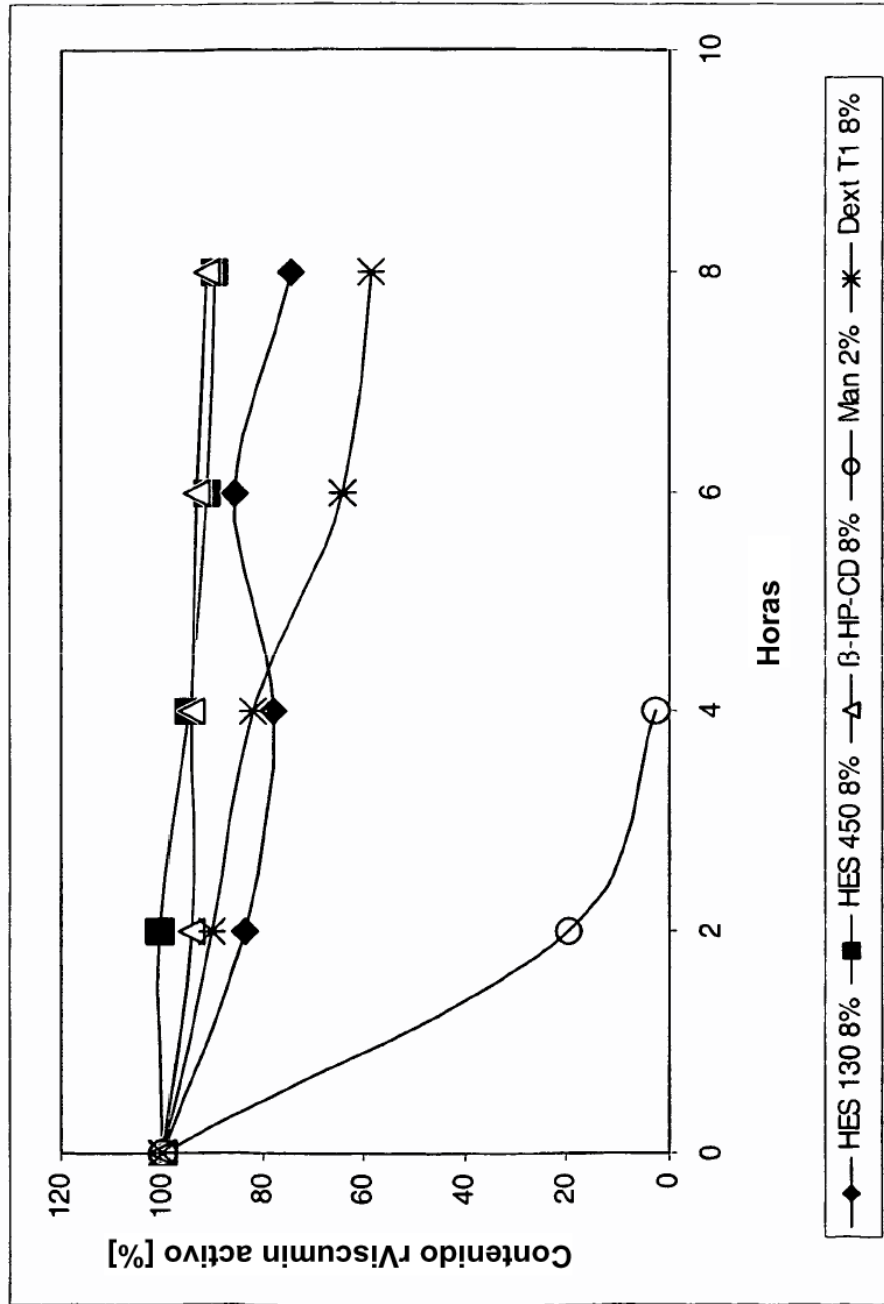


Figura 9

Figura 10



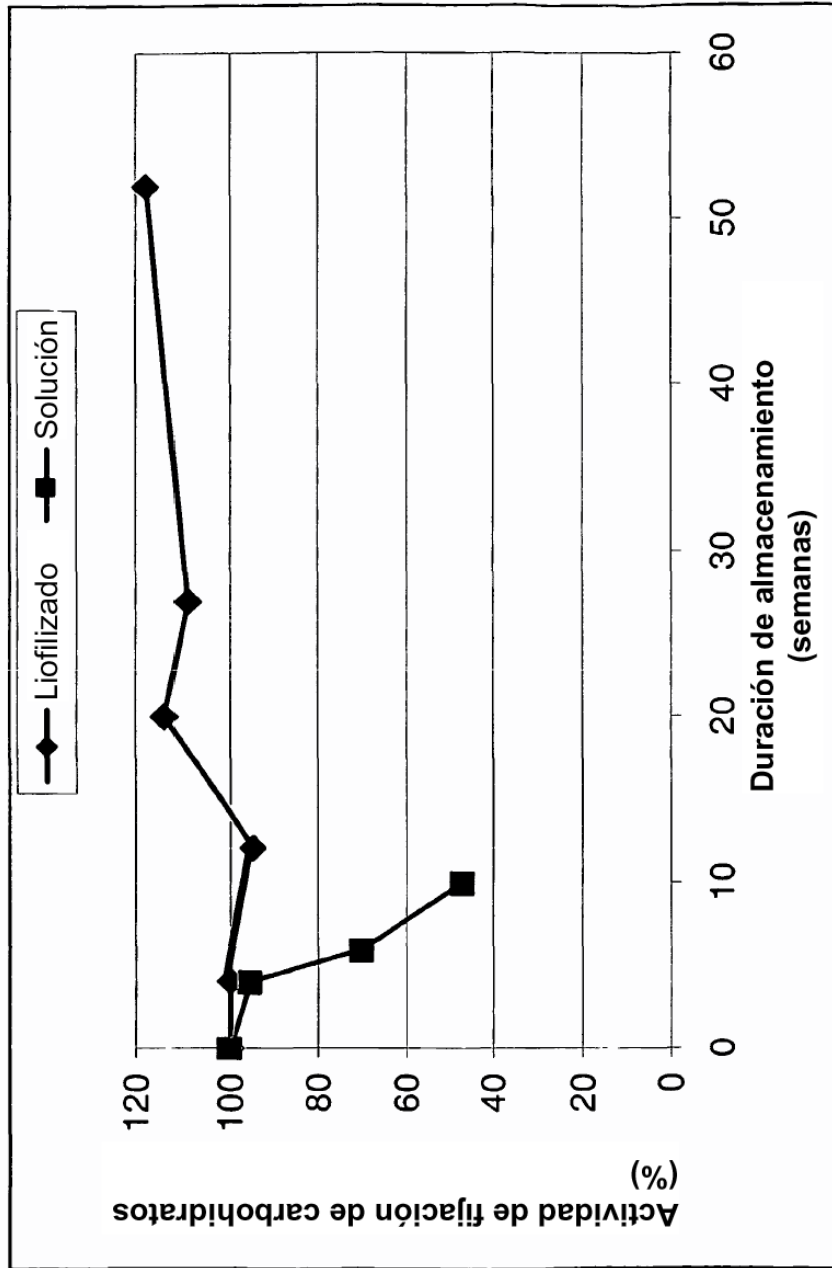


Figura 11