

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 376**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014** **PCT/CZ2014/000133**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015** **WO15070828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014** **E 14814733 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 3071218**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene una mezcla de proenzimas y enzimas**

30 Prioridad:

18.11.2013 CZ 20130891

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2019

73 Titular/es:

TRNKA, FRANTISEK (50.0%)
Cechova 42
370 01 Ceske Budejovice, CZ y
DOLEZAL, PAVEL (50.0%)

72 Inventor/es:

TRNKA, FRANTISEK y
DOLEZAL, PAVEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 707 376 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

Composición farmacéutica que contiene una mezcla de proenzimas y enzimas

5 **Campo técnico**

La invención trata de nuevas composiciones farmacéuticas que contienen una mezcla de proenzimas y enzimas con efectos anti-proliferativos y anti-metastásicos.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las enfermedades neoplásicas malignas representan un gran grupo de enfermedades que son una de las peores causas de muerte curables. Recientemente, causan el 13 por ciento de las muertes por año. (Jemal A. *et al.*, CA: *Cancer J. Clinic.*, 61, 2011, 69-90.). La ocurrencia de tumores malignos conlleva peligros dados por la capacidad de las células tumorales a cambiar las células adyacentes, mientras que se producen nuevos vasos sanguíneos, células de soporte adicionales y metástasis.

La farmacoterapia anti-neoplásica es una parte importante de amplio espectro de los enfoques de tratamiento actuales. En términos de posición terapéutica, la farmacoterapia de las enfermedades neoplásicas se divide en adyuvante (afectan así a la denominada enfermedad residual, p. ej., después de una operación quirúrgica), no adyuvante (operación precedente y tratamiento de radiación, dirigido a la desvitalización y a la inhibición tumoral) y metoterapia (aplicación a largo plazo de dosis mínimas de citostáticos que afectan a la neoangiogénesis en formas avanzadas de enfermedades neoplásicas.

Las autoridades que participan, como la Organización Mundial de la Salud OMS, Administración Federal de Fármacos (FDA), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) o la Institución Estatal de Control Farmacéutico (SÚKL, Praga, CR) registran recientemente más de 260 sustancias para farmacoterapia de la enfermedad oncológica, clasificada por la OMS (Centro de Colaboración para Metodología de Estadísticas de Fármacos) de acuerdo con los criterios de aplicación, terapéuticos y químicos en tres subgrupos principales de acuerdo con el código ATC: (<http://www.whooc.no/>; en línea desde 25-6-2012): 1. Citostáticos (con 5 subgrupos), 2. medicamentos hormonales (2 subgrupos), 3. inmunostimulantes (4 subgrupos) y 4. inmunosupresores (5 subgrupos). Alrededor de 160 sustancias de grupos inmunoestimulantes e inmunosupresores tienen licencia de la FDA en la actualidad. Con respecto a la clasificación ATC, numerosos detalles de sustancias anti-neoplásicas y sus actividades del mecanismo se pueden hallar por ejemplo en la monografía actual Avendano, C, Menéndez, J. C.: *Medicinal Chemistry of Anticancer Drug. Elsevier*, 2008, Ámsterdam. 441 s.

Se describen en el listado de sustancias y mecanismos antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, inhibidores de la función hormonal, sustancias radicales reactivas, fotosensibilizadores, agentes de alquilación de ADN, interactores de huso de separación de ADN, intercaladores e inhibidores de la topoisomerasa, tubulina y microtúbulos, sustancias atacantes, inhibidores de las señales de crecimiento del cáncer y la proliferación.

La clasificación basada en mecanismos biológicos celulares parece ser muy interesante desde el punto de vista teórico, así como para fines prácticos. Se respeta totalmente el hecho de que la interacción mutua entre el fármaco, el tumor y su huésped es lógicamente responsable de la respuesta final a la terapia (Wu, Xi-Z.: *Medical Hypotheses* 66, 2006, 883-887). Desde este punto de vista, los fármacos anti-neoplásicos se dividen en sustancias citotóxicas y modificadores biológicos de células que matan las células tumorales. A menudo se utilizan como medicamentos básicos. Los otros dos grupos, los moduladores de la respuesta biológica y los moduladores bioquímicos, contienen sustancias que se consideran medicamentos utilizados en la terapia adyuvante combinada.

Los resultados de la investigación intensiva reciente sobre los mecanismos de los efectos de los citostáticos, las sustancias anti-neoplásicas de inmunomodulación y los avances en la investigación biofarmacéutica han producido un espectro extremadamente amplio de hallazgos, pero también de nuevas preguntas.

Ahora está claro que el crecimiento, la actividad y las funciones celulares normales están coordinados y regulados por una red multilateral de vías de señales que reciben las moléculas de señal extracelular y a través de una cascada de proteínas y la activación de la transcripción de genes coordinan una amplia gama de procesos como el crecimiento, la proliferación, la invasión y la apoptosis (Dowward, J., *Nature* 411, 2001, 759-762). Las nuevas estrategias están dirigidas a las interacciones de tipo proteína-proteína (Wells, J.A., McClendon, C.L., *Nature* 450, 2007, 1001-1009), que sin duda también se utilizan en nuestra nueva composición con un mayor papel de la estructura terciaria de sustancias de este tipo en parámetros farmacodinámicos y particularmente en parámetros inherentemente farmacocinéticos.

Se puede añadir que, en general, cualquier intervención en tal sistema complicado y aún así poco conocido siempre conduce a algunas consecuencias, que son sin embargo no siempre conocidas o previsibles o positivas. Los inconvenientes de la presente farmacoterapia en oncología también están vinculados a ellas.

Desventajas de la presente farmacoterapia oncológica

Los carcinomas humanos se producen como subsecuencia de diversos factores y sus propias células además de influir en la señalización celular y en las vías que regulan la proliferación celular y el tiempo de supervivencia de las otras células. La señalización celular compleja en una célula cancerígena es modificada, el número de estímulos a los que los tumores reaccionan disminuye, pero aumenta la intensidad de reacción. Esto representa la base del aumento de la sensibilidad de los tumores a las tensiones genotóxicas e influencias inmunes (O'Driscoll, L., *Cur. Cancer Drug Targets* 9, 2009, 250-251).

El éxito del tratamiento del cáncer varía mucho hoy en función de un tipo particular de malignidad. Algunos tipos de enfermedades cancerígenas, p. ej., seminoma testicular, leucemia infantil, y algunos linfomas son muy sensibles al tratamiento anti-neoplásico (Gonzalez-Angulo, A.M. *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 608, 2007, 1-22). Otras enfermedades malignas del cáncer muestran solamente una respuesta limitada (si existe) y ninguna terapia eficaz está disponible contra ellas en estos momentos. (Jemal, A. *et al.*, *CA Cancer J. Clin.*, 60, 2010, 277-300). En los casos de tumores avanzados con metástasis desarrolladas, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento paliativo en los mejores casos. Si se define la tasa de éxito de la farmacoterapia actual por el tiempo de supervivencia de los pacientes con cáncer, se descubre que este parámetro esencial de tratamiento no ha cambiado casi factualmente durante los últimos 30 años. El éxito alcanzado ha hecho que se atribuya a los diagnósticos oportunos (Hemminki, K., *Annals Oncol.*, 23, 2012, 760-764). Además, la mayoría de los medicamentos anti-neoplásicos clínicamente aprobados se caracterizan por una estrecha ventana terapéutica, que está particularmente relacionada con su alta toxicidad sistémica (Lowenthal, R. M.; Eaton, K., *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 10, 1996, 967-90). La resistencia contra los medicamentos anti-neoplásicos representa otro problema grave, especialmente en el tratamiento a largo plazo (Redmond, K. M. *et al.*: *Front. Biosci.*, 13, 2008, 5138-5154), ya sea basado internamente en células tumorales (resistencia intrínseca) o adquirido. La resistencia múltiple contra un mayor número de sustancias anti-neoplásicas, a menudo de diferentes estructuras y funciones, aparece más y más a menudo (Wu, Ch.-P. *et al.*; *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 12, 2011, 609-620). Esta resistencia clínica es multifactorial y heterogénea con numerosos mecanismos moleculares. (Glickman, M.S., Sawyers, C, *Cell* 148, 2012, 1089-1098). El historial relativamente corto del tratamiento del cáncer biológico diana ya ha sido cubierto con un amplio espectro de resistencias (Gorre, M.E. *et al.*, *Science* 293, 2001, 876-880).

Probablemente los aspectos más críticos de la farmacoterapia oncológica están vinculados a un mayor riesgo de inducción no deseada de respuestas inmunogénicas o efectos tóxicos puesto que la mayoría de los nuevos medicamentos que pertenecen a los grupos ATC3 y ATC4 son principios activos supramoleculares de origen principalmente biotecnológico. Pertenecen a los llamados productos biofarmacéuticos, hoy en día productos biológicos, productos terapéuticos de proteínas, y cada uno de ellos tiene en realidad un potencial para afectar a cientos de procesos fisiológicos en un paciente (Yang, J. A.; Hastings Sci. Tech L. J., 3, 2011, 217, 1-18), que representa un crecimiento sustancial en comparación con medicamentos con molécula pequeña. Los riesgos de las respuestas inmunes incluyen hipersensibilidad, anafilaxis, reacción anafilactoide pseudoalérgica, enfermedad en serie, reacción a la infusión, reducción del efecto terapéutico (Borges, S. *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 74, 2006, 61-74; Barbosa, M.D.F.S., *Drug Disc. Today* 16, 2011, 345-53), generación de anticuerpos contra la reacción del medicamento y reacción cruzada entre anticuerpos por proteínas terapéuticas y endógenas (Wager K., Jones, G.: *Cur. Biotechnol.*, 297, 2012, 297-317). Esto sin duda ofrece demandas extendidas para las condiciones de producción (Singh, S. K., *J. Pharm. Sci.*, 100, 2011, 354-87), incluyendo mecanismos de control (EM. 2007. Ref. Doc. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006).

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003946.pdf, lo que afecta el precio de los medicamentos. Esta es también la razón por la que estos medicamentos se utilizan a menudo no solo monoterapéuticamente, sino también en combinaciones con agentes quimioterapéuticos convencionales, secuencialmente y en enlace a otros métodos físicos y/o quirúrgicos.

El hecho de que en un 98 por ciento de los casos solo esté vinculado a la inyección parenteral o a la administración de infusión es otra desventaja de la farmacología actual de tumores por sustancias del grupo biológico. Esto significa que el enfoque de administración parenteral y formas de medicamento relacionadas se elaboran en detalle. Por otra parte, todas las principales desventajas de la administración parenteral en sí permanecen sin resolver, a causa de un mayor riesgo de infección por la marca de aguja respecto al incumplimiento del paciente, incluso en el enlace del hospital y su personal cualificado. La inmensa mayoría de los productos biológicos solo tienen una semivida plasmática corta y tienen que ser aplicados por infusión.

La referencia anterior a las desventajas existentes de la farmacoterapia oncológica significa en general que aún se requieren enfoques conceptuales y prácticos alternativos al tratamiento de la enfermedad anti-neoplásica (Sachlos, E., *et al.*, *Cell* 149, 2012, 1284-1297), y que el intervalo existente de sustancias anti-neoplásicas tiene que extenderse por medicamentos que no tienen las desventajas que resumen brevemente lo anterior o que son al menos capaces de reducirlas.

Divulgación de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. La solución se basa en una composición farmacéutica que

contiene una mezcla de proenzimas y enzimas, que consiste en proenzimas tripsinógeno y quimotripsinógeno y enzimas α -amilasa y lipasa como principios activos en las relaciones reivindicadas, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para la administración simultánea, separada y posterior de la composición por vía parenteral o transmucosa, mientras que la composición tiene efectos anti-proliferativos y anti-metastásicos contra los tumores cancerígenos y tiene por objeto un uso terapéutico, profiláctico y anti-metastásico en mamíferos.

La composición farmacéutica tiene una relación ventajosa de sustancias enzimáticas activas, es decir, actividades de tripsinógeno (T), quimotripsinógeno A (CH), α -amilasa B.s (A) y lipasa T.a. (L) para la relación T:CH:A:L expresada en U.I. en el intervalo comprendido de 150:150:40:1 a 400:1.200:200:1.

La composición farmacéutica anterior contiene ventajosamente tripsinógeno de tipo 1, quimotripsinógeno de tipo A, α -amilasa es producida por *Bacillus sp.* y lipasa proviene de *Triticum aestivum*.

La actividad enzimática mínima de principios activos en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es ventajosamente como sigue: tripsinógeno 40 U.I./mg, quimotripsinógeno 60 U.I./mg, α -amilasa 20 U.I./mg y lipasa 1 U.I./mg.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención es particularmente adecuada para administración sublingual sistémica, rectal, por inhalación o parenteral.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede contener numerosas sustancias como excipientes farmacéuticamente aceptables, en particular uno o más alcoholes polihídricos hidrófilos incluyendo polietilenglicol de peso molecular de 100 a 8.000, y/o alcoholes hidrófilos de bajo peso molecular como glicerol, propilenglicol, n-propanol, y/o sacáridos como trehalosa, manitol, lactosa, sorbitol, mioinositol, y/o polisorbato como polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, poloxámeros como poloxámero 182, poloxámero 417, poloxámero 908, y/o uno o más excipientes lipófilos incluyendo triglicéridos hidrogenados como trioleato de glicerol hidrogenado, cocoato de glicerol hidrogenado, y/o ésteres de ácidos grasos superiores con glicerol o propilenglicol como glicerol-tripalmitato, glicerol-trioleato, glicerol-triesterato, glicerol-diestearato, glicero-dioleato, glicerol-monolaurato, propilenglicol-miristato, glicerol-dipalmitoesterato, y/o ésteres de alcoholes inferiores monovalentes como diisopropil-adipato, isopropil-laurato, isopropil-linoleato, isopropil-palmitato, y/o ésteres de ácidos grasos superiores con alcoholes grasos medios y superiores, incluyendo miristil-esterato, capril-esterato, cetil-palmitato, caprin-behenato, lauril oleato, y/o alcoholes grasos superiores, incluyendo alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol palmitílico, alcohol estearílico, alcohol behenílico y ácidos grasos superiores análogos como ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico, lignocérico, araquidónico, behénico y sus derivados etoxilados como polietilenglicol 10 oleil alcohol, polietilenglicol 25 estearil alcohol, polietilenglicol 40 estearil alcohol, estearoil polietilenglicol 32 glicerol, polietilenglicol 15 hidroxí esterato y/o aceites vegetales, incluyendo aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de ricino, y sus derivados etoxilados como polioxi 35 ricinoleato, y/o fosfolípidos incluyendo lecitina de huevo, lecitina de soja, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilserina, y/o esteroides que incluyen colesterol y sus derivados como linoleato de colesterilo, acetato de colesterilo y/o polímeros biocompatibles y biodegradables, en particular poliésteres como ácido poli-DL-láctico (PDLLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-DL-láctico-glicólico (PLGA).

Si la composición farmacéutica está diseñada para una administración sublingual, se presenta ventajosamente en forma de nanofibras, mientras que contiene al menos uno de los polímeros polivinílicos como polivinilpirrolidona de peso molecular de aprox. 30.000 a 50.000 y alcoholes polivinílicos de peso molecular de 20.000 a 200.000, de derivados de celulosa como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y/o polisacáridos de tipo almidón como hidroxietilalmidón, sal sódica de carboximetilalmidón y/o dextrinas de peso molecular de 4.000 a 80.000, y/o polisacáridos biotecnológicos de tipo dextrano de peso molecular de 10.000 a 80.000, y/o sustancias de tipo glucuronato como mucílago de xantano, y/u otros poliurónidos, especialmente sus sales, en particular de sodio, de potasio, como hialuronanos, alginanos, pectinanos, arabinanos y/o polímeros a base de ácidos acrílicos, metacrílicos y/o sus copolímeros como polímeros de carboxivinilo (carbómeros) reticulados con polialquénil éteres de azúcares o polialcoholes (como dialil sacarosa, dialilpentaeritritol, poliésteres biodegradables de α -hidroxiácidos como (PDLLA), (PGA), (PLGA), policaprolactonas de peso molecular de 10.000 a 100.000, otros excipientes poliméricos de tipo copolímero como polivinilcaprolactama-polivinilacetato de polietilenglicol.

Si la composición farmacéutica o su parte está diseñada para una administración por inhalación, también contiene ventajosamente al menos uno o más sacáridos, incluyendo trehalosa, manitol, glucosa y/o diversas formas de lactosa.

La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones puede presentarse ventajosamente en forma de una preparación estabilizada por nanofibras para administración directa de principios activos o como almacenamiento estabilizado de principios activos en un producto intermedio o en la preparación final.

Una composición de proenzimas y enzimas representa una modificación sustancial de una terapia enzimática por su composición y eficacia. Resuelve los principales efectos secundarios del tratamiento oncológico presente basado particularmente en el impacto en los tejidos sanos divididos vivos como sistema gastrointestinal, membrana mucosa, médula, hígado y parénquima renal. Esto es por lo tanto, una terapia biológica diana en el sentido real de la palabra,

no tóxica, centrada selectivamente en células tumorales, ancho espectral desde el punto de vista de los efectos anti-neoplásicos. Afecta a carcinomas, sarcomas, así como a la malignidad hematológica aguda.

La dosificación de la composición terapéutica solo está limitada por la dosis mínima diaria en relación con el volumen de los elementos degradantes procedentes de células tumorales. Gracias a la no toxicidad intrínseca de la composición de acuerdo con la invención, cuando particularmente o solo los productos degradantes de células tumorales descompuestas pueden tener un efecto tóxico, la composición también puede utilizarse para fines de diagnóstico y de hecho con respecto a la experiencia adquirida en la aplicación de métodos *in vivo* de control de la eficacia en las líneas de células tumorales cultivadas en ratones es obvio que la composición de acuerdo con la presente solicitud tendrá un efecto anti-neoplásico no solo en seres humanos, sino que afecta contra los tumores que afectan a los animales, p. ej., también se puede contar con un perro o un gato. Sin embargo, hay que tener en cuenta su diferente anatomía, así como su inmunogenicidad, si bien tales influencias casi no se pueden predecir.

La dosis mínima diaria significa una cantidad de la composición anti-neoplásica que asegura la terapia completa o parcial de enfermedades tumorales o el efecto de diagnóstico o profiláctico requerido con respecto al estado actual de la enfermedad tumoral y en relación con el método de administración seleccionado.

La estabilización de los componentes individuales de una composición anti-neoplásica con cuatro elementos de acuerdo con la presente solicitud se resuelve con el fin de elaboración en una preparación farmacéutica y con los fines de administración por medio de excipientes y procedimientos que garantizan la preservación y de hecho la regeneración de las estructuras supramoleculares secundarias y superiores de los componentes activos parciales.

La administración sistémica por formas no invasivas, que puede ser aplicada ventajosamente a la composición anti-neoplásica de acuerdo con la invención resuelve uno de los problemas importantes de hoy en día de administración de medicamentos biológicos (productos biológicos, productos terapéuticos de proteínas etc.), que es el medio tiempo plasmático corto de estas sustancias en el organismo.

Divulgación detallada de la invención

La nueva solución de acuerdo con la invención es fundamental, observada empíricamente a partir de influencias en trofoblastos como modelo biológico de tumores malignos, incluso a nivel molecular (Soundarajan, R., Rao, J., *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2, 2004, 15 (<http://www.rbej.com/content/2/1/15>, en línea: 30-06-2013). La solución se basa en el concepto clásico de J. Beard (Beard, J.: *Lancet* 168, 1905, 281-283), que propuso el tratamiento de carcinomas avanzados por extractos pancreáticos recientes. Su actividad antitumoral se basó en el potencial proteolítico. Supuso que las enzimas producidas por el páncreas limitan la invasión trofoblástica y concluyó que los extractos pancreáticos deben tener efectos de inhibición similares a los tumores invasivos. En los años siguientes, el extracto de enzimas pancreáticas se examinó a fondo durante ese tiempo. Se descubrió que inhiben de manera realmente muy eficaz el crecimiento cancerígeno incluso en pacientes en estadio avanzado de neoplasma maligno (Goeth, R.A., *J. Am. Med. Assoc.* 1907; 1030). Con respecto a varios informes posteriores sobre los efectos negativos de la administración de extractos pancreáticos procesados de manera muy imperfecta, la investigación fue abandonada durante un largo periodo (Gurchot, Ch., *Oncology* 31, 1975, 310-333). Las excepciones trazables posteriores de los últimos años (p. ej., Maeda *et al.*: patente de la UE. 0215 662 A2, 1986) solo mencionan las proteasas, no las proenzimas proteasa, zimógenos.

La hipótesis de que las proenzimas y no las enzimas activadas son los componentes cruciales de los efectos del extracto se formuló en primer lugar y luego se elaboró en detalle por F. Trnka (Trnka, F. *et al.*: patente de la UE 0743 070 A2, 1996; patente de la República Checa 283 972, 1998; patente de Estados Unidos 5.858.357; 1999). Hace unos treinta años, este autor descubrió y confirmó experimentalmente el hecho de que una mezcla de tripsinógeno, quimotripsinógeno y amilasa, aproximadamente en las concentraciones propuestas por J. Beard, tiene un fuerte efecto anti-tumoral, anti-invasivo y anti-angiogénico. Uno de los efectos de las proenzimas anteriores y su mezcla con amilasa es la inhibición de la migración de células tumorales a nivel celular. F. Trnka *et al.*, también descubrieron (Novak, J., Trnka, F.: *Anticancer Res.*, 25, 2005, 1157-1177), que la exposición continua de las células tumorales a una baja concentración de las sustancias mencionadas anteriormente conduce a la formación de agregados celulares y a la inhibición de metástasis. Logró combinar los datos históricos con los nuevos hallazgos y dedujo que

- (a) las proenzimas proteasa son resistentes a la inactivación de los inhibidores de la proteasa,
- (b) la activación de la proenzima solo se produce en una membrana celular tumoral,
- (c) las proteasas activas serina destruyen la superficie celular de las células tumorales, tienen un efecto apoptótico, que son los hallazgos sustanciales en los que se basa la presente invención.

Una de las características de la invención por lo tanto es que aún no se ha descrito la integración de la enzima lipasa en la composición anti-neoplásica y su eficacia de ancho espectral es distribuida de nuevo y confirmada por nosotros.

Efecto de una mezcla de proenzimas de la proteasa y enzimas hidrolíticas

La importancia de la aplicación *in vivo* de proenzimas proteasa en lugar de proteasas activas se basa en la existencia de anti-proteasas plasmáticas, que junto con las proteasas forman complejos que impiden la penetración de la proteasa en la superficie celular tumoral (Currie, G.A., Bagshawe, K.D., *Lancet* 279 (7492), 1967, 708-10). Estas anti-proteasas son particularmente alfa-1 antitripsina y alfa-2 macroglobulina (Lah, T. T. *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 6, 2006, 257-279), para las cuales las proenzimas son ilegibles. El efecto selectivo anti-tumoral de proenzimas de proteasas pancreáticas se basa en presencia de un inhibidor secretor pancreático (PSTI) formado por células acinares pancreáticas, que protegen contra la autodigestión. Este inhibidor también se descubrió en las superficies de las células de la membrana mucosa del estómago, intestinos delgado y grueso, en las células de adenoma, pero no en las células de carcinoma (Bohe, H. *et al.*, *J. Clin. Pathol.*, 43, 1990, 901-904).

La no participación en cascada de hemocoagulación y el carácter invasivo de tumores malignos es otra ventaja de la aplicación de proenzimas. Gracias a la actividad de la tripsina de tumores malignos, las proenzimas proteasa se activan selectivamente en las células tumorales. Esta propiedad de las proenzimas que elude el efecto protector anti-proteasa no afecta a las células tumorales *in vitro*, donde no es importante si se utilizan proteasas activas o sus proenzimas. Por medio de ensayos *in vitro*, se ha demostrado un impacto de agregación en las células tumorales y por medio de ensayos adicionales *in vivo*, también se ha demostrado un impacto inhibitorio sobre la proliferación tumoral y las metástasis en varias líneas cruciales de células tumorales humanas.

El hallazgo de que las células que no respondieron sucumbieron a la apoptosis fue importante (Trnka F. *et al.*, patente de la UE 0743 070 A2, 1996; Novak, J.F., Trnka, F., Chernin, M. I., AACR Meeting Abstracts, abril de 2006; 1023-1024.) Otros autores describieron el papel supresor de la tripsina respecto a la progresión del tumor por un mecanismo epigenético (Yamashita, K. *et al.*, *Cancer Res.*, 63, 2003, 6575-6578), o efectos anti-proliferativos de una alfa-amilasa potente en células de ratón o de cáncer humano por mediación de la adhesión celular y la estimulación de anoikis celulares de tipo apoptosis (Fedrowitz, M. *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 30, 2011, 102-114). Asimismo se probó la elevación del nivel plasmático de endostatina y angiostatina, y por lo tanto también la limitación del neoplasma vascular.

El efecto de la amilasa en las células tumorales se está estudiando de nuevo, así como el papel de tripsinógeno y quimotripsinógeno (Itkonen, O., *Scandin J. Clin. Lab. Invest.*, 70, 2010, 136-143; Koskensalo, S. *et al.*, *Oncology* 82, 2012, 234-241) y el efecto de las lipasas (Nomura, D. K. *et al.*, *Cell* 140, 2010, 49-61), es decir, hidrolasas de triacilglicerol, EC 3.1.1.3 como proteasas serina, cuyo uso combinado es el principio del efecto de la composición de cuatro elementos de acuerdo con la presente solicitud de la invención.

El efecto anti-metastásico de la composición terapéutica, de diagnóstico y profiláctica de acuerdo con la invención se extiende de nuevo y aumenta en comparación con el estado anterior de la técnica mediante la adición de lipasa vegetal (Aub, J.C., Tieslau, C., *Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 50, 1963, 613-619), caracterizado en el punto activo por una tríada de aminoácidos de histidina-asparagina.

El efecto terapéutico se demostró en ratones nu/nu, tanto en la administración subcutánea y rectal de la preparación en ensayos estandarizados con líneas trasplantadas de manera subcutánea de células humanas de carcinoma de mama, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata y cáncer de pulmón de células pequeñas.

Hoy en día, se asigna el efecto anti-tumoral universal de la composición independientemente del origen de los tumores afectados a la presencia de la molécula sializada de la glicoproteína coriogonadotropina (Currie, G.A., Bagshawe, K.D., *Brit. J. Cancer* 22, 1968, 848-853; Willey, K.P. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, (1989), 1971, 619-729; Acevedo H.F. *et al.*, *Cancer* 69, 1992, 1818-1928; Acevedo H.F. *et al.*, *Cancer*. 78, 1996, 2388-99), que se considera que es la estructura diana para quimotripsinógeno (Regelson W., *Cancer* 76, 1995, 1299-1301; Illes R.K.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, 260-262, 2007, 264-270) y amilasa (Varki, N.M., Varki, A., *Lab. Invest.* 87, 2007, 851-857). Este centro sializado es probablemente el portador o mediador de las propiedades invasivas y metastásicas de tumores malignos (Nguyen, D.H., Tangvoranuntakul, P., Varki, A., *J. Immunol.*, 2005; 175, 228-236).

La aplicación innovadora de la lipasa ha sido respaldada por el reciente hallazgo de D. K. Nomura *et al.* que demostraron experimentalmente que la lipasa monoacilglicerol (MAGL) regula la creación de ácidos grasos libres en las células cancerígenas, lo que les permite crear una señalización lipídica oncogénica que aumenta la migración, la invasividad de las células tumorales, el crecimiento tumoral y la patogenicidad. Descubrieron por medio de un enfoque proteómico basado en el análisis de decenas de hidrolasas serina de orden superior que los niveles MAGL se incrementan de forma permanente a la derecha en las células de los tumores agresivos y probablemente también pasan la agresividad a las células no agresivas (Nomura, D.K., Long, J.Z., Niessen, S., *et al.*, *Cell* 140, 2010, 49-61).

El efecto anti-neoplásico de amplio espectro de la nueva composición se da por su nueva estructura, que acepta las complejas relaciones en el organismo de los seres humanos o animales vivos. No impide la ocurrencia de células tumorales, sin embargo, destruye las células tumorales que ya han aparecido, restaura y mantiene equilibrios complejos del entorno biológico en una condición normal y saludable, limita la ocurrencia y la propagación de señales oncogénicas.

Los visualizadores de la terapia basada en la administración de una composición anti-neoplásica como la transpiración, la respiración, la orina y los excrementos de olor específico también son interesantes y aplicables en la práctica. Además se acompaña de cansancio, somnolencia o incluso dolores en los músculos. Todas estas señales son importantes, subjetivamente y clínicamente indicadores legibles del contacto del medicamento con el tejido afectado por el tumor. En realidad no indican toxicidad de la preparación como tal, pero la toxicidad de los productos es resultado de su impacto en las células tumorales. En este sentido, estas señales también representan un importante indicador de si el tejido tumoral está presente en el organismo o no. A menos que cualquiera de los signos anteriores se produzca después de dos o tres días de administración de dosis terapéuticas iniciales habituales de la composición de acuerdo con la aplicación, existe un grado muy alto de certeza de que las células tumorales no están presentes en el individuo. En otras palabras, con una toxicidad mínima, la composición de acuerdo con la invención puede ser utilizada en el sentido anterior para el diagnóstico de la enfermedad tumoral en un periodo asintomático en individuos que no han notado aún ningún síntoma de la enfermedad.

En esta relación se debe mencionar la posibilidad del uso de hemodíalisis o en realidad de hemoperfusión, que se puede aplicar si es necesario en la administración de tales dosis de la composición de acuerdo con la invención que podría poner en peligro la función importante de la vida del paciente como una subsecuencia de la destrucción de las células tumorales. Tal enfoque requiere ciertamente orientación especializada y supervisión de un oncólogo clínico.

El principio del uso profiláctico de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la invención puede ser básicamente descrito analógicamente. Con respecto a la propia toxicidad mínima de la preparación, un periodo de administración de dosis terapéuticas de la composición se puede incluir en el proceso de seguimiento oncológico del paciente. Si las células tumorales y por lo tanto el sustrato para la actividad de los componentes de preparación estaban presentes en el organismo, la administración de la preparación ya podría de hecho proporcionar su efecto profilácticamente con los síntomas anexos anteriores.

El efecto de diagnóstico y profiláctico combinado de administración a corto plazo de la composición también aparece de este modo en un individuo en el que aún no se han producido signos de la enfermedad oncológica. A no ser que alguno de los síntomas descritos anteriormente se produzca después de la administración de la preparación, este hecho puede considerarse lógicamente una prueba indicativa de salud oncológica.

La solución de acuerdo con la invención se basa en la composición de dos proenzimas del grupo tripsinógeno y quimotripsinógeno con alfa-amilasa y lipasa (en lo sucesivo también referido colectivamente como principios activos) definida desde el punto de vista de la actividad. Esta composición de cuatro elementos muestra en las condiciones *in vivo* efectos sorprendentemente positivos y sustanciales hacia un amplio espectro de células tumorales de características histológicas completamente diferentes, como se ha mencionado anteriormente, tanto después de la administración subcutánea por inyección y administración transmucosa no invasiva, particularmente administración rectal.

Componentes parciales de la composición anti-neoplásica

La composición de acuerdo con la invención representa una combinación de enzimas y proenzimas obtenida por extracción de órganos (tejidos) de animales (particularmente mamíferos), plantas y/o sustancias producidas por métodos de cultivo utilizando moldes y microorganismos o p. ej., mediante perfusión continua de las células de mamíferos y el procesamiento consecuente de sobrenadantes. Con la mejora de los métodos de separación y análisis, la proporción de cultivo de productos del proceso está creciendo.

En el nivel actual de conocimiento en el campo de la biotecnología resulta prácticamente posible obtener las proenzimas apropiadas (Jungo, C., Marison, I., von Stockar, U.; J., *Biotechnol.*, 128, 2007, 824-837; Paulová, L. *et al.*, *J. Biotechnol.*, 157, 2012, 180-188) y las enzimas apropiadas, es decir, todos los principios activos necesarios de la composición por ambos enfoques básicos.

Los procedimientos de producción conducen por lo general a la producción de proteínas y polipéptidos aislados, que se recogen con cuidado de su entorno natural, se separan e identifican. Los contaminantes procedentes de material natural pueden afectar al uso terapéutico, de diagnóstico y profiláctico de las proteínas y polipéptidos. Pueden contener no solo los componentes de las proteínas, sino también numerosos contaminantes de diversos caracteres. Pueden dirigir a un cambio de la composición de proteína natural original en particularmente a su glicosilación, cambio secundario o cambio de estructuras supramoleculares superiores, lo que podría conducir a reacciones inmunes indeseables u otras cuando se administran a un organismo vivo. Se considera probado hoy en día que no solo la estructura primaria de las proteínas decide sobre sus interacciones finales en el organismo, sino que obviamente, de manera particular, las estructuras terciarias y secundarias de las proteínas, tienen interacciones físicas y químicas directas con el entorno biológico.

Debido al hecho de que cualquier pequeño cambio en las condiciones puede causar resultados indeseables principalmente en procedimientos de cultivo, es necesario un control muy detallado y costoso de los procesos de producción, pero también de la calidad de los productos finales. Se sabe que esto es también la razón por la cual el

precio de los productos biológicos está en promedio de más de veinte veces superior a los costos de los medicamentos obtenidos por los métodos de la química de baja molécula convencional o procedimientos de extracción y purificación de órganos y tejidos de animales y plantas comúnmente accesibles.

- 5 Por lo tanto, es necesario definir no solo sus estructuras primaria secundaria y terciaria originales, pero también para su uso posterior, las desviaciones aceptables de los modelos de proteínas y polipéptidos en su estado natural original. Esta es la razón por la cual no solo se definen requisitos de pureza, p. ej. 95 % o preferentemente incluso 99 % (dependiendo también del método de evaluación de pureza seleccionado), cantidades de residuos aceptables, p. ej. en la terminación N-terminal de la proteína de la secuencia interna de aminoácidos proteína o glicosilación de la cadena de aminoácidos, pero también la diferencia del porcentaje aceptable de la estructura de aquellas partes de la proteína o polipéptido que son importantes para el efecto.

- 10 Por otra parte, hay que destacar que ya se ha demostrado que los cambios en la estructura primaria de la enzima, p. ej., en las proteasas serina no tienen que producir un cambio de función de la enzima si la estructura supramolecular de la parte activa de la enzima se conserva (Kraut, J., *Annu. Rev. Biochem.*, 46, 1977, 331-58).

- 15 A continuación, pero también como un hecho importante es, que incluso la secuencia de aminoácidos primaria, a pesar de que es auténtica con el modelo de proteína humana, no garantiza la inmunocompatibilidad, como se ha probado p. ej., para la eritropoyetina (Prabhakar, S. S., Muhlfelder, T., *Clin. Nephrology* 47, 1997, 331-335) o interferón- α 2B (Oberg, K. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1989, 531-535).

- 20 Las consecuencias importantes para el uso previsto de las enzimas cumplen con los hechos anteriores. En general se acepta que en la mayoría de los casos de distribución de la enzima en la circulación del sistema y su comportamiento en el organismo son controlados por la combinación de su tamaño, la carga, la posición y la inclusión de grupos funcionales de superficie hidrófila. Existe información de cómo estas propiedades afectan al enlace a proteínas, el comportamiento en la circulación, la interacción con células endoteliales vasculares, lechos capilares extravasales, en la distribución por medio de estroma tisular y la comunicación final con las células diana. Sin embargo, principios unificadores que describen lo que es mejor para las partículas del medicamento con proteínas, particularmente en los organismos vivos en condiciones *in vivo*, no existen todavía.
- 25 Desde este punto de vista, las estructuras para la creación específica de los productos farmacéuticos son todavía demasiado complejas y el conocimiento existente de sus mecanismos de interacción es aún insuficiente.

- 30 Incluso en el contexto de enfermedades tumorales, se debe recordar siempre que la actividad de las enzimas, así como las proenzimas expresadas en los métodos definidos arbitrariamente no tiene que corresponder a la actividad anti-tumoral de los principios activos individuales.

- 35 En definitiva, es necesario definir correctamente y de forma reproducible productos biológicos, proenzimas y enzimas. Esta es la razón por la cual la definición de la composición de acuerdo con la invención no se basa en peso, sino en unidades de actividad enzimática.

- 40 La importancia de este enfoque es evidente p. ej., a partir de la comparación de dos proenzimas disponibles comercialmente de dos proveedores diferentes: quimotripsinógeno con actividad declarada > 40 U.I./mg vs. quimotripsinógeno A con actividad = 1.422,3 U.I./mg (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1143?lang=en®ion=CZ>; <http://www.applichem.com/en/home-page/>). Esta es la razón por la cual la exigencia para la definición de la actividad biológica es tan crucial para la facilidad de uso de la información sobre composición farmacéutica biológica, p. ej., en la forma de la actividad por unidad de peso (por lo general miligramo) por volumen dado o por una dosis. Esta forma de expresar la actividad enzimática se sigue utilizando incluso por los fabricantes de renombre aunque en el mundo de la ciencia, la expresión de la actividad enzimática en catals (cat) como unidades derivadas del sistema SI ha sido considerada correcta durante un largo tiempo (1 U: 60 = μ catal; 0,01667 U = μ catal y 60 μ catal = U).

- 50 Una diferencia importante entre la composición de acuerdo con la invención y patentes anteriores por Trnka, F. *et al.* o Psaledakis N. G. (Psaledakis N.G. patente de Estados Unidos 4.514.388, 1985), también inspirada por los hallazgos de J. Beard se basa también en este aspecto. Esta diferencia es también esencial en comparación con las patentes análogas o solicitudes de patente por Kenoy, J. N. *et al.* basado en la misma idea que está oculta en la misma mediante una declaración heterogénea de otras reclamaciones relacionadas con diversos antioxidantes y otras sustancias potencialmente cancerostáticas de carácter heterogéneo. (Kenyon J. N. *et al.*, Austral. solicitud de patente 2010310887, 2012; solicitud de patente de Estados Unidos 13/502.917, 2012; documento EP 2490711 A1, 2012). Además, la definición de la composición de las preparaciones enzimáticas de las dos últimas patentes mencionadas se refiere, de hecho, a que no puede estar basada en el peso de sus sustancias, sino en su actividad enzimática.

- 60 Los procedimientos de producción de las sustancias de la composición de acuerdo con la invención que incluye liofilización final habitual o secado por pulverización utilizan el conocimiento de la tecnología ahora bien descrito y disponible en la extensa literatura científica y de patentes. No solo permiten la obtención de productos de alta pureza no inmunogénicos, sino también productos que pueden ser modificados a diferencia de sus modelos naturales.

Algunas de estas modificaciones están dirigidas a la mejora de algunas propiedades de sus modelos, en su mayoría propiedades de estabilidad o parámetros farmacocinéticos. El otro lado de este progreso y recientemente incluso un problema es el hecho de que la producción rutinaria de modificación de proteínas, enzimas y polipéptidos sirve para la elusión de la protección de patentes existentes de las sustancias originales, sus composiciones y preparaciones o en realidad el abuso de la llamada forma de biosimilares. Las autoridades competentes de la legislación están tratando de encontrar y poco a poco de llegar a un consenso en este campo, en cooperación con la comunidad científica. Los datos necesarios para la caracterización de los medicamentos biológicos, y también de los productos terapéuticos de proteína se han formulado gradualmente para los biosimilares en las directivas EMA (Ref. Doc. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006).

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003946.pdf (en línea desde 30-10-2013) y el borrador de la FDA <http://www.fda.gov/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>, (en línea desde 10-30-2013), el enfoque de las dos autoridades reguladoras es de alguna manera diferente, la FDA es más reservada.

Es por lo tanto necesario señalar que cada proenzima (zimógeno) y cada enzima de nuestra composición anti-neoplásica propuesta se puede obtener en decenas de diferentes formas hoy en día, algunas de los cuales, naturalmente, tendrán el mismo efecto que la sustancia utilizada y ensayada por nosotros y algunas no. Los expertos en las disciplinas apropiadas saben que decenas de sustancias que pertenecen al mismo grupo de clasificación de enzimas de acuerdo con el número EC tienen estructuras primarias diferentes, es decir, diferentes números y órdenes de aminoácidos en cadenas, diferentes números y posiciones de puentes disulfuro, partes hidrófobas e hidrófilas de diferentes longitudes y ubicaciones, diferentes lugares para la sustitución, diferentes sustituyentes particulares, p. ej., diferentes unidades de azúcar unidas glicosídicamente en diferentes lugares y por lo tanto por ejemplo un comportamiento diferente en un entorno acuático, comportamiento en las interfaces, que puede tener diferentes posiciones de lugares activos para la reacción con el sustrato. Todo esto está dado por el origen y por el método de producción de los zimógenos y enzimas individuales.

Los datos y las características de las bases de datos científicas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>, en línea desde 30-04-2013); y PDB <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, en línea desde 30-04-2013) se utilizaron para la especificación de la definición de proenzimas y enzimas de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la presente solicitud de patente.

Las sustancias individuales de la composición anti-neoplásica pueden ser descritas por estas características y el grado de similitud de posibles variaciones dentro de que los mismos efectos tanto de los componentes parciales como de la composición anti-neoplásica en su conjunto puedan ser definidos posteriormente.

Por consiguiente, se considera importante para la composición de acuerdo con la invención que la similitud de las variantes particulares de zimógenos y enzimas utilizados en la misma sea aproximadamente especificada cualitativamente por secuencias de aminoácidos de las cuatro sustancias ensayadas (véanse los Ejemplos 2.1, 3.1., 4.1 y 5.1). En términos del efecto, se deben considerar sustancias similares con al menos una correspondencia del 70 % (y superior) de lugares activos y las secciones de las estructuras primarias de los componentes individuales de la composición de cuatro elementos, es decir, una correspondencia del 70 % para tripsinógeno de tipo I de páncreas bovino, para tripsinógeno A de páncreas bovino, para α -amilasa producida por *Bacillus sp.*, y la misma correspondencia del 70 % para la lipasa de *Triticum aestivum*.

Sigue siendo cierto que no importa cuán importante sean la secuencia de aminoácidos de la enzima y su estructura primaria, la enzima participa en el propio efecto en su estructura supramolecular con las posiciones particulares de los lugares activos. Las otras partes de la enzima son importantes en un contexto dado para su farmacocinética.

La necesaria estabilización de la composición anti-neoplásica con el fin de su elaboración en la preparación farmacéutica se basa en la estabilización de los componentes individuales. Estos componentes tienen que ser valorados y evaluados como no inmunogénicos para el procesamiento respecto a la preparación utilizable y su administración. Su estabilización para el procesamiento y la aplicación se resuelve mediante el uso de excipientes y procedimientos que desde el punto de vista del estado actual de la tecnología garantizan la conservación (o regeneración) de estructuras secundarias y supramoleculares superiores de los componentes activos parciales y por tanto la de la composición de cuatro elementos de acuerdo con nuestra aplicación como un todo (Lee, G.: *Spray drying of proteins*, en: Carpenter, J. Manning M. (Eds), *Rational Protein Formulation: Theory and Practice*. Plenum Press, Nueva York, 2002, 135-158). Esto resulta particularmente de la aplicación de procedimientos de soluciones de procesamiento o dispersiones de proteínas por liofilización, liofilización por pulverización, secado supercrítico, posiblemente combinación de diálisis y secado por pulverización o métodos de dispersación criogénica. Si es necesario, estos métodos se combinan con aplicación de una preparación de sustancias estructuralmente estabilizantes, en particular sacáridos, p. ej., sorbitol, trehalosa, sacarosa (Maury, M. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59, 2005, 251-261), polímeros, p. ej., polietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, dextranos (Platz, R. *et al.*: patente de Estados Unidos 6.019.468, 2000), lípidos, p. ej., triglicéridos de cadena media (Hauss, D.J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 59, 2007, 667-76; Tan, A., Rao, S., Prestidge, C. A.; *Pharm. Res.*, 2013, 1-25), tensioactivos seleccionados p. ej., dipalmitoilfosfatidilcolina, polisorbatos, estearatos de polioxietileno (Mansour, H.M., Damodaran, S., Zografi, G.: *Mol. Pharm.*, 5, 2008, 681-695), crioprotectores, p. ej. glicerol, etilenglicol, propilenglicol, dimetil

sulfóxido; hidroxietilalmidón, polivinilpirrolidona (Meryman H.T.; *Cryobiology* 8, 1971, 173-183).

La mezcla de polietilenglicoles (PEGs) de pureza adecuada p. ej., estabiliza los principios activos física y químicamente y también es adecuada para el procesamiento de los principios activos en las estructuras de aplicación, tanto para tipos de administración no invasiva y administración parenteral. Los efectos de estabilización de glicerol y n-propanol se han descrito de manera similar y son utilizables. La solución de la mezcla anti-neoplásica de acuerdo con la invención en un contexto dado utiliza de este modo la información publicada en la purificación, regeneración, estabilización de estructuras supramoleculares, a saber, para todos los componentes parciales de la composición de acuerdo con la invención (Pellegrini-Malpiedi, L, Picó, G. A, Nerli, B. B., *Separ. Purif. Technol.*, 78, 2011, 91-96; Porfiri, M.C. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, 49, 2011, 7-13; Bassani, G. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, 859, 2007, 222-228).

Métodos de administración y formas de aplicación

Existe un hecho conocido y generalmente aceptable de que la administración oral de productos terapéuticos de polipéptidos y proteínas para un organismo de un cuerpo humano o animal vivo a través del tracto gastrointestinal representa un problema básico que no ha sido resuelto incluso parcialmente todavía. Las condiciones en el estómago o los intestinos en realidad podrían destruir completamente tal medicamento o prevenir su absorción en la forma activa. Esta es la razón por la cual se utiliza predominantemente una aplicación parenteral en la actualidad para la administración de productos biológicos o proteínas terapéuticas, a la que pertenece la composición de acuerdo con la invención.

La composición de la mezcla y su dosificación puede ser modificada en detalle de acuerdo con la forma de aplicación seleccionada y por consiguiente, también de acuerdo con el vehículo utilizado para el principio activo particular y la dosificación en condiciones clínicas puede ser definida y optimizada de acuerdo con el estado actual de la enfermedad tumoral o de acuerdo con la respuesta del organismo a la dosis administrada. La composición anti-neoplásica de acuerdo con la invención, permite básicamente un enfoque de tratamiento ambulatorio. Además permite la auto-administración en particular cuando se utilizan métodos de administración no invasiva, y el uso de tipos de preparación correspondientes, p. ej., por administración sublingual o rectal. Se considera que estas son dos maneras ventajosas para la administración de la composición de acuerdo con la invención, así como un método de inhalación a través de las paredes alveolares del pulmón. La buena tolerancia a la preparación y la ausencia de síntomas alérgicos u otras respuestas inmunológicas u otras biológicas negativas del paciente son ciertamente las condiciones básicas.

La administración parenteral con todas sus alternativas presentadas por el último desarrollo tecnológico en este campo, obviamente, se puede aplicar a la administración de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la invención. Las inyecciones en seco, incluyendo liofilizadas, es decir, mezclas de formas pulverizadas de principios activos y sustancias auxiliares, modificadores del pH, osmolaridad, humectabilidad, solubilidad, protección antioxidante, en el caso de productos liofilizados también excipientes de tipo crioprotector (glicerol, dimetil sulfóxido), lioprotectores y sustancias estructurales. Estas preparaciones se dispersan en el vehículo líquido adecuado en el momento de uso y se administran por aguja de inyección.

Las preparaciones para inyección con liberación de principio activo prolongada o modificada de otro modo, que liberan el principio activo lentamente y durante más tiempo después de la administración, cuando es deseable, p. ej. en la aplicación intraperitoneal también se pueden utilizar. Excipientes adicionales, de los cuales ambos lípidos se degradan lentamente y los sistemas poliméricos biodegradables a base de polímeros u oligómeros de ácido glicólico, ácido láctico y sus co-polímeros probados (Chaubal, M.V. *et al.*: *Excipient selection and criteria for injectable dosage forms*. en: Kathdare, A., Chaubal, M.V.: *Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology and Drug Delivery Systems*. InformaHealthcare, Nueva York, Londres 2006, 271-290; Gokarn, Y.R. *et al.*, *Excipient for protein drug*. 291-331. en: Kathdare A., Chaubal M.V.: *Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems*. InformaHealthcare, Nueva York, Londres 2006, 291-331) se utilizan para la administración de depósito.

La administración al epitelio alveolar, que es el más penetrable y en términos de superficie útil de los alvéolos es absolutamente la superficie de la mucosa más grande, debe ser la más adecuada desde este punto de vista. El medicamento molecular bajo inhalado puede aparecer en la circulación del sistema en segundos, que está muy cerca de la administración intravenosa. Este rasgo de aplicación por inhalación sin embargo no es importante para la composición de acuerdo con la invención. La hora de inicio del efecto en cuestión es de segundos o minutos no es importante en este caso, y para las sustancias macromoleculares es inalcanzable. El segundo factor, pero más importante en esta relación, es el hecho de que la penetración de las partículas inhaladas a través del complicado árbol de los bronquios y bronquiolos de ramificación hasta la superficie alveolar ya se ha resuelto satisfactoriamente. Los hallazgos recientes muestran que a diferencia de los fármacos de broncodilatación y antiasmáticos, el tamaño óptimo de partículas sólidas para la administración sistémica de medicamentos pulverizados secos de tipo proteína es de alguna manera menor, es decir, 2 a 4 micrómetros (Patton, J.S., Byron, P.R., *Nat. Rev. Drug Discovery* 6, 2007, 67-74). Este requisito puede que ya esté tecnológicamente cumplido hoy en día. El problema pasa de este modo a la esfera técnica de la ingeniería de partículas y solución técnica inhaladora. El movimiento de retroceso de

partículas de los alvéolos (Scheuch, G. *et al.*, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, 23(S2), 2010,39-5; Forbes, B. *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63, 2011, 69-87), sin embargo, fisiológicamente deseable, queda sin resolverse desde el punto de vista biofarmacéutico. Probablemente, esto sea aparte de razones comerciales, una de las causas de la administración por inhalación de insulina insuficientemente reproducible en el pasado, que ya se resolvió mediante la innovación con inhaladores e inmediatamente también mediante la modificación de la insulina sin portadores (Balduci, A.G. *et al.*, *Eur. J Pharm. Sci.*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.009>, en línea desde 18 de septiembre de 2013).

La composición de acuerdo con la invención cumple con los requisitos de capacidad de procesamiento en la forma de polvo de inhalación tanto sin excipientes adicionales como con vehículo adecuado (p. ej., trehalosa, lactosa, manitol), sustancia de tipo polietilenglicol de bajo y medio peso molecular (p. ej., macrogol 300 o macrogol 1500) y sus mezclas. La inhalación de dispersión de agua de la composición de acuerdo con la invención preparada en el momento de aplicación utilizando nebulizadores (p. ej., eléctricos o ultrasonidos) a partir de dispersiones de agua preparadas *ex tempore* con el contenido de los excipientes anteriores, pero también dextranos y agentes tensoactivos adecuados (p. ej., polisorbatos) podría tener el mismo efecto. La composición de acuerdo con la invención también es adecuada para su transformación en micropartículas de lípidos, en la que pueden ser útiles sus ventajas de estabilización y manejo y propiedades particularmente ventajosas como sistemas de aplicación para la administración de inhalación de proteínas (Chow, A.H.L. *et al.*, *Pharm. Res.* 24, 2007, 411-437; Mehnert, W., Mäder, K.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 2012, 83-101).

Puesto que diversos métodos prácticamente aplicables de aplicación de administración por inhalación (transalveolar) de la composición de acuerdo con la invención existen desde el punto de vista de las posibles tecnologías para la producción de partículas adecuadas para la inhalación desde el punto de vista de la física y la estabilidad, se presenta una de las que se adoptaron de la literatura (Byrappa, K., Ohara, S. Adschiri, T., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60, 2008, 299-327), en el Ejemplo 12 de la realización del procedimiento criogénico de la creación de partículas de la composición anti-tumoral por inhalación.

La declaración análoga también se aplica al aspecto tecnológico de la formulación de los métodos parciales individuales de la administración parenteral. Se aplicó particularmente la administración de la inyección subcutánea de las documentadas en la aplicación. Otros métodos parciales de administración parenteral de la composición de acuerdo con la presente solicitud de patente p. ej., intraperitoneal, intratecal son variantes adicionales que se consideran posibles (Huynh, G. H., Deen, D. F., Szoka, F. C., *J. Control. Rel.*, 110, 2006, 236-259). Son adecuadamente manejables desde el punto de vista tecnológico de la formulación, sin embargo las propiedades inmunológicas exactas de todas las sustancias utilizadas, es decir, la pureza inmunológica de los componentes de la composición de acuerdo con la invención y por supuesto la respuesta biológica apropiada serán decisivas para su uso.

Las razones de los métodos anteriormente estresados no invasivos de administración de la composición de acuerdo con la invención son, excepto para los demás, basados en los hechos de que tanto las membranas mucosas sublingual y rectal representan barreras biológicas esencialmente permeables y también adecuadamente accesibles, a través de las cuales penetran incluso medicamentos multimoleculares. Las velocidades del comienzo del efecto del medicamento son completamente satisfactorias para el efecto antitumoral deseado. Además, es bien sabido que las sustancias de estos métodos de administración no sufren el efecto de un primer paso rápido en la membrana biológica de absorción en sí mismo (al contrario que en la pared del intestino) después de la absorción.

Se considera el hecho de que se ha descubierto una combinación de la composición anti-neoplásica y el vehículo de aplicación en la administración rectal en experimentos *in vivo* en el efecto anti-tumoral de ratones nu/nu contra una línea de tumor seleccionada, a saber, la línea A 549 de tumor de pulmón de células pequeñas mostró resultados significativamente mejores que en la administración de las mismas dosis de la misma composición por inyección subcutánea, un verdadero hallazgo innovador. El transporte de sustancias al lugar afectado por el tumor es probablemente más complicado después de la administración subcutánea.

La solución propuesta por los inventores vinculada en la actualidad con el método de administración sublingual, que en principio permite el inicio de un efecto rápido del medicamento (o ligeramente más rápido) como administración por inyección subcutánea, es relativamente avanzada. Su ventaja básica es que asegura una transferencia más lenta y más duradera para la circulación del sistema para sustancias con moléculas grandes (p. ej., 50.000). Se puede por lo tanto hablar en realidad de la infusión por vía sublingual. Tal administración sublingual tiene una ventaja sustancial contra la administración parenteral, incluyendo la administración subcutánea. Esto es el hecho de que las sustancias después de la absorción por la membrana mucosa sublingual no se toman por el torrente sanguíneo directamente al hígado, en el que son principalmente metabolizadas y se desactivan, pero evitan el efecto de primer paso del hígado. La ruta y el tiempo de su movimiento en el organismo son, por tanto mucho más largos y permiten que sustancias no metabolizadas lleguen a las partes más distantes del cuerpo. Esto es por lo que se considera el método sublingual muy ventajoso, también para la administración de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la invención.

La desintegración rápida y los comprimidos sublinguales solubles o comprimidos liofilizados rápidamente solubles, la

tecnología de los cuales está bien descrita y prácticamente aplicada, se puede utilizar generalmente para la administración sublingual. Este problema con otras formas de aplicación como aerosoles, geles, pastas, emplastos, películas y tiras se trata en detalle por el último resumen de V. Hearnden (Hearnden V. *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 2012, 16-28). En el caso de productos biológicos, el reflejo de deglución y la inhibición del medicamento por el contenido de saliva son los principales problemas de la aplicación de este método.

Un nuevo tipo de preparación sublingual (nueva forma de dosificación) adecuada para los productos biológicos gracias a su composición y propiedades se basa en la aplicación de membranas de nanofibras (Stránská, D. *et al.*: patente checa 303 244; 2012). Por su diseño y mediante el uso de polímeros farmacéuticamente aceptables adecuados ayudan a evitar problemas habituales de otros productos sublinguales, particularmente su interacción con la saliva o tragar parte sustancial del medicamento. Estas membranas de nanofibras tienen excelentes propiedades mecánicas, por lo general activan hasta un 50 por ciento de los principios activos, incluyendo productos biológicos, para ser incorporados directamente en las fibras. Incluso un porcentaje en peso más alto de principios activos puede ser anclado por impregnación. En la producción en masa, se producen ventajosamente, p. ej., por medio de electrohilado. En general, utilizan polímeros transportadores y estructurales del grupo de alcohol polivinílico, polilactida, policaprolactona, polivinilpirrolidona, sus copolímeros, copolímero de polietilenglicol/caprolactama de polivinilo/acetato de polivinilo, derivados de celulosa como p. ej., hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, dextranos de diversos pesos moleculares, aislado así como en mezclas y también numerosos monómeros polimerizados de mezclas de al menos dos de ellos. Una variante en la que los principios activos se integran directamente en el material de nanofibras de la capa activa de preparación diseñada para el contacto con la membrana mucosa, que está cubierta por otra capa de nanofibras, p. ej., poliuretano (véase el Ejemplo 12) que protege los principios activos contra el contacto con la saliva es la más importante para la composición de acuerdo con la invención.

Además, y esto puede ser sustancial, la deposición de productos biológicos en nanofibras es, probablemente, la forma más prospectiva hoy en día de estabilización de productos biológicos. En comparación con la exigencia de técnicas criogénicas y tecnologías de pulverización, este método es considerado desde el punto de vista de la temperatura mínima y la carga de presión sobre el principio activo y desde el punto de vista de la integración de su estructura en el portador de fibra. (Klein, S. *et al.*, *Biomacromolecules* 10, 2009, 1751-1756). Gracias a las tecnologías de producción en masa de hilatura electrostática, la composición anti-neoplásica de acuerdo con la invención puede ser procesada de hecho no solo en nanomembranas para la aplicación directa de los principios activos, sino también en el producto intermedio estabilizado y productos tipo productos biológicos para almacenamiento, todo ello realmente sin pérdida de actividad biológica de los principios activos (p. ej., de tipo proteínas, polipéptidos, virus o bacterias).

El método de administración rectal proporciona las mismas ventajas en términos de evitación del efecto de primer paso y el intervalo de transporte más largo para moléculas terapéuticas no metabolizadas. Excepto por problemas menores, que son absolutamente insignificantes en relación con el sentido y la importancia de la administración rectal de la combinación anti-neoplásica de acuerdo con la invención, este método puede ser definitivamente considerado ventajoso como se ha demostrado en varias ocasiones para la composición de acuerdo con la invención por los ensayos *in vivo* mencionados anteriormente.

La administración sistémica rectal de medicamentos se utiliza tradicionalmente, bien ensayada, respaldada por una selección relativamente amplia de excipientes y tecnologías de fabricación adecuadas. Se puede utilizar excipientes convencionales, es decir, sustancias no iónicas del grupo que contiene lípidos neutros, p. ej., tri-, di- o monoésteres de ácidos grasos superiores y polioles, p. ej., glicerol, glicéridos de polioxietileno, p. ej., polioxietilenglicol, cocoato de glicerilo, polioxietilenglicoles, éteres de polietilenglicol y alcoholes grasos superiores, p. ej., alcohol laurílico, aceites polares de polioxietileno, p. ej., aceite de ricino, aceite de sacaro-glicéridos, copolímeros de óxido de polietileno y óxido de propileno y sus mezclas, si es necesario con antioxidantes seleccionados (p. ej., tocoferoles, ácido ascórbico, sus derivados como ascorbato de tocoferilo) y otras sustancias auxiliares.

El principio de "co-administración" se puede utilizar para alcanzar los niveles eficaces de la composición anti-neoplásica en el organismo. Esto significa la administración de todas las partes de la composición en cantidades tales que aseguran un efecto al mismo tiempo con respecto al método de aplicación o en diferentes momentos por medio de la preparación de una aplicación o más preparaciones de aplicación. Esto puede ser una única "co-administración" o múltiples administraciones a intervalos particulares. Con la posibilidad de utilizar varios métodos de administración, una parte de la composición se puede administrar por uno de los métodos posibles (p. ej., por vía rectal) y la otra parte necesaria para alcanzar niveles eficaces de la composición en el organismo puede ser administrada por diferentes métodos, p. ej., por vía sublingual o parenteral.

Innovación

La innovación esencial de la solución de acuerdo con la invención se basa en la integración aún no descrita de una enzima lipasa en una composición anti-neoplásica y su eficacia de amplio espectro probada. La composición de nuevo diseño de la preparación muestra en ensayos *in vivo* una suma de actividades que llevan un complejo, sorprendentemente fuertes efectos anti-tumorales celulares. Este hallazgo se basa en los resultados obtenidos de

de ensayos *in vivo* en ratones nu/nu con células implantadas subcutáneamente de líneas estandarizadas de carcinoma de mama humano, carcinoma colorrectal, carcinoma de páncreas y carcinoma de pulmón de células pequeñas.

- 5 Una innovación adicional de la invención reside en la definición de composición a base de unidades de actividad enzimática, no en proporciones en peso de los principios activos individuales, como en la forma de patentes similares de forma remota (Trnka *et al*, 1996, 1998, véase más arriba). Este enfoque de la definición de eficacia asegura la viabilidad técnica de la invención y la reproducibilidad de la composición de los principios activos, y por tanto, también de las formas apropiadas diseñadas para su administración al organismo. Las farmacopeas de hoy
10 incluyen un requisito para utilizar las características de la actividad de las enzimas.

Una innovación adicional de la solución de acuerdo con la invención está en el hecho de que se ha demostrado y aplicado sobre los resultados obtenidos de los métodos no invasivos ventajosos de administración y de los sistemas de dosificación apropiados para la administración de la composición que contiene enzima y proenzima. A diferencia
15 de todas las patentes existentes que tratan la administración de productos biológicos, se han propuesto preparaciones para la administración transmucosal no invasiva en gran escala de las indicaciones de la composición anti-tumoral de acuerdo con la invención. Sorprendentemente, los resultados terapéuticos positivos de la administración rectal mostró el camino a la administración sublingual. Esto nos brinda la posibilidad de mejorar el cumplimiento de un paciente y la posibilidad de la auto-administración de la preparación anti-neoplásica.

La innovación de la solución reside también en el hecho de que se definen vehículos adecuados para la administración de la composición en relación directa con la forma de aplicación seleccionada y también los requisitos terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos definitivos. Particularmente, el polietilenglicol de peso molecular apropiado o una mezcla de polietilenglicoles seleccionados (p. ej., macrogol 300 y macrogol 1500 en relación en
25 peso 45:55) o glicerol, N-propanol o trehalosa y otros sacáridos (sacarosa, manitol) como estabilizadores estructurales para las proteínas son excipientes ventajosos para los principios activos de forma individual, así como para sus composiciones. La solución de acuerdo con la invención también considera la aplicación de sustancias lipídicas polietoxiladas (p. ej., estearoil polioxil-6-glicérido), lípidos neutros (p. ej., gliceril-palmitoestearato), ésteres de alcoholes monovalentes con ácido graso superior (p. ej., miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo) en el
30 procesamiento de la composición antitumoral pulverizada anhidra y potenciadores de la permeación, p. ej., glicerol, ciclopentadecanolida, policarbofil-cisteína.

La innovación de la solución también reside en la preparación y uso de los excipientes estructurales y de estabilización anteriores así como la tecnología de hilatura electrostática para el procesamiento de los componentes individuales en una composición estabilizada de proenzimas y enzimas como una formulación del producto intermedio (véase el Ejemplo 11, Ejemplo 12).

Descripción de las figuras

40 La Fig. 1 muestra una parte de la fotodocumentación comparando visualmente el ratón tratado y no tratado con una línea de carcinoma de mama MDA-MB-231 trasplantada subcutáneamente en el ensayo *in vivo* de 36 días en la administración rectal diaria de la composición anti-neoplásica.

La Fig. 2 muestra una interpretación gráfica de valores medios de los volúmenes tumorales (incluyendo DT) en el ensayo *in vivo* de 36 días en ratones nu/nu con línea de carcinoma de mama MDA-MB-231 trasplantada subcutáneamente en la administración subcutánea y rectal diaria de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la presente solicitud (composición K1, o K2 de acuerdo con la Tabla 1); ratones nu/nu hembra; aprox. 28 g; 8 ratones en cada grupo; vehículo supositorio lipófilo; dosis 2 representa doble cantidad de la composición K2.

La Fig. 3 muestra una parte de la fotodocumentación comparando visualmente el ratón tratado y no tratado con una línea de carcinoma colorrectal H116 trasplantada subcutáneamente en el ensayo *in vivo* de 75 días de la administración rectal y subcutánea diaria de la composición anti-neoplásica.

La Fig. 4 muestra una interpretación gráfica de valores medios de los volúmenes tumorales (incluyendo DT) en el ensayo *in vivo* de 75 días en ratones nu/nu con línea de carcinoma colorrectal H116 trasplantada subcutáneamente en la administración subcutánea y rectal diaria de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la presente solicitud; ratones nu/nu hembra; aprox. 28 g; 8 ratones en cada grupo; vehículo supositorio lipófilo.

La Fig. 5 muestra una parte de la fotodocumentación comparando visualmente el ratón tratado y no tratado con una línea de carcinoma pancreática CAPAN 2 trasplantada subcutáneamente en el ensayo *in vivo* de 85 días de la administración subcutánea y rectal diaria de la composición anti-neoplásica.

La Fig. 6 muestra una interpretación gráfica de valores medios de los volúmenes tumorales (incluyendo DT) en el ensayo *in vivo* de 85 días en ratones nu/nu con una línea de carcinoma pancreática CAPAN 2 trasplantada subcutáneamente en la administración subcutánea y rectal diaria de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la presente solicitud; ratones nu/nu hembra; aprox. 28 g; 8 ratones en cada grupo; vehículo supositorio lipófilo.

La Fig. 7 muestra una parte de la fotodocumentación comparando visualmente un ratón tratado y no tratado con una línea de carcinoma de pulmón de células pequeñas A549 trasplantada subcutáneamente en el día 40^a y 85^a del ensayo *in vivo* en la administración diaria de la composición anti-neoplásica.

La Fig. 8 muestra una interpretación gráfica de valores medios de los volúmenes tumorales (incluyendo DT) en un ensayo *in vivo* con una línea de carcinoma de pulmón de células pequeñas A549 trasplantada subcutáneamente en la administración rectal diaria de la composición anti-neoplásica (K2 de acuerdo con la Tabla 1), ratones hembra nu/nu; aprox. 28 g; 8 ratones en cada grupo; vehículo supositorio hidrófilo.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Estructura cualitativa de la composición anti-neoplásica de acuerdo con la solicitud de la invención

1. Amilasa: Alfa-amilasa de *Bacillus* sp. Tipo II-A, polvo liofilizado. Aislado de *Bacillus amyloliquefaciens*. Sigma-Aldrich. Praga. N.º producto: A 6380; EC n.º. (Sigma): 232-560-9; EC n.º: 3.2.1.1; n.º CAS: 9000-90-2
Peso molecular: 58.403
Actividad: 1.333 U.I./mg de sustancia sólida; 3.100 m.j/mg de proteína

2. Lipasa: lipasa de germen de trigo, tipo I; polvo liofilizado. Aislado de *Triticum aestivum*. Sigma-Aldrich. Praga. N.º producto L: 6380, n.º EC. (Sigma): 232-619-9
EC 3.1.1.3; n.º CAS: 9001-62-1
Peso molecular: 143.000
Actividad: 5-15 U.I./mg de proteína

3. Quimotripsinógeno: α -quimotripsinógeno A de páncreas bovino, polvo liofilizado, sin contenido de sal. Applichem. Praga. N.º producto: A069
N.º CAS: 9035-75-0
Peso molecular: aprox. 25.000
Actividad: mín. 1.200 U.I./mg

4. Tripsinógeno: tripsinógeno de páncreas bovino. Polvo dializado y liofilizado, sin contenido de sal. Sigma-Aldrich. Praga. N.º producto: T1143; n.º EC (Sigma): 232-651-3; n.º CAS: 9002-08-8
Peso molecular: 23.700
Actividad: 10.900 U.I./mg de proteína

Tabla 1: Ejemplos de combinación de peso proporcional de partes de la composición anti-neoplásica para la formulación de las preparaciones para los diversos métodos de administración. La composición cualitativa se presenta en el Ejemplo 1.

Identificación	Composición 1	Composición 2	Composición 3	Composición 4	Composición 5
Método de administración	Subcutánea	Rectal	Sublingual	Inhalación	Intraperitoneal
Cantidad	mg	mg	mg	mg	mg
Amilasa	2,07	4,07	5,6	1,95	9,6
Lipasa	2,89	9,89	12,8	9,89	12,2
Quimotripsinógeno	10,24	14,24	14,24	28,5	14,2
Tripsinógeno	29,58	22,32	29,58	14,24	35,0

Los componentes individuales de la composición pueden ser procesados de acuerdo con las reglas habituales como una mezcla de polvo y luego como un producto intermedio hacia la forma de dosificación requerida. Los componentes finamente molidos individuales también pueden estar integrados gradualmente en un vehículo preparado o su parte para el fin de procesamiento primario con un portador adecuado (p. ej., trehalosa para la administración por inyección, véase el Ejemplo 12, estabilización de excipiente (p. ej., n-propanol, polietilenglicol 300) o vehículo completo (grasa endurecida con adición de isopropil-miristato como base de supositorio) de acuerdo con una aplicación particular prevista (véase el Ejemplo 8 y el Ejemplo 9).

En el procesamiento y en el posible almacenamiento de las composiciones, los requisitos de los fabricantes de los componentes individuales tienen que ser mantenidos (p. ej., temperatura, humedad, atmósfera protectora, pureza ambiente).

La cantidad específica de la composición terapéutica requerida para la administración de una dosis a un ser humano depende de las características del individuo particular (peso, edad, parámetros de condiciones de salud, incluyendo la reactividad individual a la composición administrada), características de la enfermedad anti-neoplásica (p. ej., tipo, ubicación, etapa), método de administración (p. ej., sublingual sistémica, infusión parenteral, rectal sistémica), modo de aplicación (p. ej., monoterapéutico, secuencial, graduado) y el carácter físico de la preparación (p. ej., solución coloide, mezcla de polvo separada).

Los Ejemplos 2.1, 3.1, 4.1 y 5.1 representan secuencias de aminoácidos de sustancias enzimáticas y proenzimáticas para composiciones anti-neoplásicas de acuerdo con el Ejemplo 1 y la Tabla 1. Los ejemplos relacionados de referencia 2.2, 2.3, 3.2 az 3.4, 4.2 y 5.2 representan secuencias de aminoácidos de los representantes de sustancias

biológicamente similares que pueden utilizarse como sustitutos de las sustancias de acuerdo con la Tabla 1 como los llamados "biosimilares" a saber, individualmente o en la estructura completa. El mantenimiento de la calidad del efecto, las actividades enzimáticas individuales de los componentes en relación a la unidad de peso de proteína son siempre importantes para tales composiciones biológicamente similar preparadas de esta manera. Esta característica es uno de los factores decisivos en la idoneidad de una composición alternativa "biosimilar" para una aplicación particular o considerada.

Los ejemplos en principio ilustran la posibilidad de sustitución de sustancias parciales, ambos, por sustancias naturales aisladas biológicamente similares o sustancias biotecnológicamente producidas.

Ejemplo 2.1: Secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa, especies de *Bacillus*, *Amyloliuefaciens* <http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=7605> (en línea desde 18 de septiembre de 2013) (véase más adelante la Tabla 1)

```

1  MIQKRKRTVS FRLVLMCTLL FVSLPITKTS AVNGTLMQYF EWYTPNDGQH WKRLQNDAEH
61  LSDIGITAVW IPPAYKGLSQ SDNGYGPYDL YDLGEFQQKG TVRTKYGTKS ELQDAIGSLH
121 SRNVQVYGDV VLNHKAGADA TEDVTAVEVN PANRNQETSE EYQIKAWTDF RFPGRGNTYS
181 DFKWHWHYHFD GADWDESRKI SRIFKFRGEG KAWDWEVSSE NGNYDYLMYA DVDYDHPDVH
241 AETKKWGIWY ANELSLDGFR IDAAKHIFKS FLRDWVQAVR QATGKEMFTV AEYWQNNAGK
301 LENYLNKTSF NQSVFDVPLH FNLQAASSQG GGYDMRRLLD GTVVSRHPEK AVTFVENHDT
361 QPGQSLESTV QTWFKPLAYA FILTRESGYP QVFGDMYGT KGTSPKEIPS LKDNIEPILK
421 ARKEYAYGPQ HDYIDHPDVI GWTREGDSSA AKSGLAALIT DPGGSKRMY AGLKNAGETW
481 YDITGNRSDT VKIGSDGWGE FHVNDGSVSI YVQ

```

Ejemplo de referencia 2.2: Secuencia de aminoácidos de α -amilasa biológicamente similar (90 %), *Triticum urartu* (einkorn rojo salvaje), (*Crithodium urartu*) <http://www.uniprot.org/uniprot/M8AC56> (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

```

1  MERRGLLKAA LLASCLLVVC SGRVPTVIQQ PSTTIYNSTL AKTLVEYAAA IYTADLTQLF
61  TWTCDRCGDL IEGFEMMDII VDVESELEAY VGFASDINAV VVFRGTQEN SIQNWIEDLL
101 WKQLDLDPYGP MPEAMVHRGF YSAYHNTTIR DGIVSGIQKT QKLHGDVPIM VTGHSMGAAM
151 ASFCALDLVV NYGLDDVKLM TFGQPRVGNA AFASYLKRYL PHAIRVTNAND IVPHLPPYF
201 SFFPQKTYHH FPREVWVHDV GLGSLVYTV E QICDDSGEDP ACSRSVSGNS IQDHITYLGV
301 SMHAEAWSSC RIVMDYAE LR YKMDLHGNVV LSKQQQSSGL SNERRRHS AQ

```

Ejemplo de referencia 2.3: Secuencia de aminoácidos de α -amilasa biológicamente similar (90 %), *Bacillus licheniformis* <http://www.uniprot.org/uniprot/P06278> (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

```

1  MKQQKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAAAAA NLNGTLMQYF EWYMPNDGQH WKRLQND SAY
61  LAEHGITAVW IPPAYKGT SQ ADVGYGAYDL YDLGEFHQKG TVRTKYGTKG ELQSAIKSLH
121 SRDINVYGDV VINHKGGADA TEDVTAVEVD PADRN RVISG EHRKAWTHF HFPGRGSTYS
181 DFKWHWYHFD GTDWDESRL NRIYKFQGA WDWEVSNENG NYDYLMYADI DYDHPDVAAE
241 IKRWGTWYAN ELQLDGFRLD AVKHIKFSFL RDWVNHVREK TGKEMFTVAE YWQNDLGALE
301 NYLNKTNFNH SVFDVPLHYQ FHAASTQGGG YDMRKL LNST VSKHPLKAV TFVDNHD TQP
361 GQSLESTVQT WFKPLAYAFI LTRESGY PQV FYGDMYGTKG DSQREIPALK HKIEPILKAR
421 KQYAYGAQHD YFDHHDIVGW TREGDSSVAN SGLAALITDG PGGAKRMYVG RQNA GETWHD
480 ITGNRSEPVV INSEGWGEFH VNGGSVSIYV QR

```

Ejemplo 3.1: Secuencia de aminoácidos de lipasa, *Tritici aestivum* (véase la Tabla 1) <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8L5T0> (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

5

```

1  MERRGLLKTA LLACLLVVCS GRVPMVIQQP STTIYNSTLA KTLVEYAAAI YTADLTQLFT
61  WTCDRCGDLI EGFEMMDIIV DVENCLEAYV GFASDINAVI VVFRGTQENS IQNWIEDLLW
121 KQLDLDPGM PEAMVHRGFY SAYHNTTIRD GIVSGIQKTR KLHGDVPIMV TGHSMGAAMA
181 SFCALDLVVN YGLDDVKLMT FGQPRVGNAA FASYFKRYLP HAIRVTNAND IVPHLPPYFS
241 FFPQKAYHHF PREVVVHDVG LGSLVYTVEQ ICDDSGEDPA CSRSVSGNSI QDHITYLGVS
301 MHAEAWSSCR IVMDYAE LRY KMDLHGNVVL SKQQQQQPGL SDQRRRHS AQ

```

Ejemplo de referencia 3.2: Secuencia de aminoácidos de la lipasa biológicamente similar, *Sus Scrofa* <http://www.uniprot.org/uniprot/P00591> (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

10

```

1  SEVCFPRLGC FSDDAPWAGI VQRPLKILPW SPKDVDTRFL LYTNQNQNNY QELVADPSTI
61  TNSNFRMDRK TRFIIHGFID KGEEDWLSNI CKNLFKVESV NCICVDWKGG SRTGYTQASQ
121 NIRIVGA EVA YFVEVLKSSL GYSPSNVHVI GHSLGSHAAG EAGRRTNGTI ERITGLDP AE
181 PCFQGTPELV RLDPSDAKFV DVIHTDA API IPNLGFGMSQ TVGHLDFFPN GGKQMPGCQK
241 NILSQIVDID GIWEGTRDFV ACNHLRSYKY YADSILNPDG FAGFPCDSYN VFTANKCFPC
301 PSEGCPQMGH YADRFPGKTN GVSQVFY LNT GDASN FARWR YKVSVTLSGK KVTGHILVSL
361 FGNEGNSRQY EIYKGTLPD NTHSDEFDSD VEVGDLQKVK FIWYNNNVIN PTLPRVGASK
421 ITVERNDGKV YDFCSQETVR EEVLLTLNPC

```

Ejemplo de referencia 3.3: Secuencia de aminoácidos de la lipasa biológicamente similar (50 %), Grupo *Oryza sativa Japonica* <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6F357> (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

15


```

1  MSSSPMLGGI ADRWRELHGQ DSWNGLLDPL DDLRSSLILS YGELVQATYD SFNRERRSPH
61  AGACVYGHGD LLAAAGASAA GSYAVTKFVY ATSGLPVPEA FLLLPLPSLL PPAWSRESNW
121 MGYVAVATDE GVAALGRRDI VVAWRGTVES LEWVNDFDFT PVPAAPVLGA AAAANPRAIV
181 HRGFLSVYTS SNKDSKYNKA SARDQVLEEV RRLMELYKDE VTSITVVGHS LGASLATLNA
241 VDIVANGANC PPASSSSSQP PCPVTAIVFA SPRVGDGFFK AAFASFPDLR ALHVKNAGDV
301 VPMYPPLGYV DVAVKLRIST SRSPYLRSPG TIETLHNLEC YLHGVAGEQG SAGGFKLEVD
361 RDVALANKGV DALKDKYPVP PRWWVSKNRC MVKDADGHWA LHDFEQI

```

Ejemplo de referencia 3.4: Secuencia de aminoácidos de la lipasa biológicamente similar, *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* DSM 10140 <http://www.uniprot.org/uniprot/C6A8G0> (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

5

```

1  MELYRNNEIP PIEYTPGTSE FRDAVIGLAR YWTATAEDLH ADEPGVQERT AAACLRFRKE
61  CAMFDYARAL QWHDPQGVYV HTDIPYLPDG GYRDGEVRGH LLDVYIPRDA IVRGGNTLPV
121 YIDIHGGGFT YGYKELNRNF NTHLADLGFG VFSLNYRPAP QTDLVGQLHD IQAALCWIGE
181 HITQFPVSPD NIFITGDSAG ACLSLLTLLI EHNDAAAHAF GIERASGIHL RGASLISGVY
241 DITPSSPMRA RLAETVGNEF FAGLDDATVF LDPADWLTQG IGIPPLFLVT SSDDFVQSET
301 LALATSLARN GRDFELHDFK VPCTQTLGHV FPGMTWLPE SERVLHGIRE FSYPLTR

```

Ejemplo 4.1: Secuencia de aminoácidos de tripsinógeno, *Bos Taurus* (véase la Tabla 1)

10 Cadena A: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1TGN_A (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

```

1  VDDDDKIVGG YTCGANTVPY QVSLNSGYHF CGGSLINSQW VVSAAHCYKS GIQVRLGEDN
61  INVVEGNEQF ISASKSIVHP SYNSNTLNND IMLIKLKSAA SLNSRVASIS LPTSCASAGT
121 QCLISGWGNT KSSGTSYPDV LKCLKAPILS DSSCKSAYPG QITSNMFCAG YLEGGKDSQ
181 GDSGGPVVCS GKLOGIVSWG SGCAQKNKPG VYTKVCNYVS WIKQTIASN

```

Ejemplo de referencia 4.2: Secuencia de aminoácidos de tripsinógeno biológicamente similar I secuencia 2, patente de Estados Unidos 7.049.484, 2006

15

```

1  CGVPAIQPVL SGLSRIVNGE EAVPGSWPWQ VSLQDKTGFH FCGGSLINEN WVVTAAHCGV
61  TTSDVUVAGE FDQGSSEKI QKLKIAKVPK NSKYNSLTIN NDITLLKLST AASFSQTVSA
121 VCLPSASDDF AAGTTCVTTG WGLTRYTNAN TPDRLOQASL PLLSNTNCKK YWGTKIKDAM
181 ICAGASGVSS CMGDSGGPLV CKKNGAWTLV GIVSWGSSSTC STSTPGVIYAR VTALVNWVQQ
241 TLAAN

```

Ejemplos 5.1: Secuencia de aminoácidos de quimotripsinógeno A, *Bos taurus* (véase la Tabla 1)

20

Cadena A http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2CGA_A (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

1 CGVPAIQPVL SGLSRIVNGE EAVPGSWPWQ VSLQDKTGFH FCGGSLINEN WVVTAAHCGV
 61 TTSDVTVAGE FDQGSSEKI QKLKIAKVKF NSKYNSLTIN NDITLLKLST AASFSQTVSA
 121 VCLPSASDDF AAGTTCVTTG WGLTRYTNAN TPDRLQQASL PLLSNTNCKK YWGTKIKDAM
 181 ICAGASGVSS CMGDSGGPLV CKKNGAWTLV GIVSWGSSSTC STSTPGVYAR VTALVNWVQQ
 241 TLAAN

Cadena B http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2CGA_B (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

1 CGVPAIQPVL SGLSRIVNGE EAVPGSWPWQ VSLQDKTGFH FCGGSLINEN WVVTAAHCGV
 61 TTSDVTVAGE FDQGSSEKI QKLKIAKVKF NSKYNSLTIN NDITLLKLST AASFSQTVSA
 121 VCLPSASDDF AAGTTCVTTG WGLTRYTNAN TPDRLQQASL PLLSNTNCKK YWGTKIKDAM
 181 ICAGASGVSS CMGDSGGPLV CKKNGAWTLV GIVSWGSSSTC STSTPGVYAR VTALVNWVQQ
 241 TLAAN

5

Ejemplo de referencia 5.2: Secuencia de aminoácidos de quimotripsinógeno biológicamente similar B (*construcción sintética, clon CDS*)

1 MAFLWLLSCW ALLGTTFGCG VPAIHPVLSG LSRIVNGEDA VPGSWPWQVS LQDKTGFHFC
 61 GGS LISEDWV VTAAHCGVRT SDVVVAGEFD QGSDEENIQV LKIAKVFKNP KFSILTVNND
 121 ITLLKLATPA RFSQTVSAVC LPSADDDFPA GTLCATTGWG KTKYNANKTP DKLQQAALPL
 181 LSNAECKKSW GRRITDVMIC AGASGVSSCM GDSGGPLVCQ KDGAWTLVGI VSWGSDTCST
 241 SSPGVYARVT KLIPWVQKIL AAN

10

Ejemplo de referencia 5.3: Secuencia de aminoácidos de quimotripsinógeno biológicamente similar B, *Gadus morhua* <http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?ID=7605> (en línea desde 18 de septiembre de 2013)

15

1 MGHEVDSVLP GLFRRTYGCG RPAISPVTG YSRIVNGEEA VPHSWWQVS LQDQTGFHFC
 61 GGS LINENWV VTAAHCNVKN YHRVVLGEHD RSSNSEGVQV MTVGQVFKHP RYNGFTINND
 121 ILLVKLATPA TLNMRVSPVC LAETDDVFEG GMKCVTSGWG LTRYNAADTP ALLQQAALPL
 181 LTNEQCKKFW GNKISDLMIC AGAAGASSCM GDSGGPLVCQ KAGSWTLVGI VSWGSGTCTP
 241 TMPGVYARVT ELRAWVDQTI AAN

Ejemplo 6: Preparación de la Composición 1 anti-neoplásica 1 por administración intravenosa por inyección para el tratamiento del carcinoma de mama humano.

20

Fórmula (g) para 100 dosis

Composición 1	2,239
Trehalosa	25,00

La mezcla se prepara como una mezcla de polvo liofilizado que contiene la Composición 1 de acuerdo con la Tabla 1 con estabilización estructural por trehalosa, posteriormente distribuida asépticamente en 100 viales. El envase de preparación contiene una ampolla con vehículo de agua de este contenido (mg/100 ml):

25

Fosfato de sodio hidrógeno dihidrato	167 mg
Dihidrógeno fosfato de potasio	20 mg
Cloruro de potasio	20 mg
Cloruro de sodio	800 mg

Polisorbato 80	10 mg
Polietilenglicol 300	3,0 ml
Agua para inyección	hasta 100,0 ml

El vehículo de agua sirve para la preparación *ex tempore* de 3 mililitros de solución a partir de polvo liofilizado seco. La dosis apropiada de la **Composición 1** en la solución resultante de 3 mililitros de volumen se aplica a continuación por infusión por gotas de una composición adecuada p. ej., con dextrano 10.000.

5 La dosificación terapéutica, de diagnóstico o profiláctica específica de la composición se basa en el examen oncológico complejo del individuo particular.

10 **Ejemplo 7:** Preparación con la composición anti-neoplásica por administración subcutánea por inyección para el tratamiento del carcinoma de mama humano.

Fórmula (g) para 100 dosis

Composición 1	2,580	(véase la Tabla 1)
Polietilenglicol 4000	5,160	

15 La mezcla se prepara como una mezcla de polvo liofilizado que contiene la **Composición 1** de acuerdo con la Tabla 1 y estabilización por polietilenglicol 4000 y, posteriormente, distribuida asépticamente en 100 viales. El envase de preparación contiene una ampolla con una solución de 8 mg de cloruro de sodio en 1 ml de agua para inyección.

20 La dosificación terapéutica, de diagnóstico o profiláctica específica de la composición se basa en el examen oncológico complejo del individuo particular.

Ejemplo 8: Preparación con la composición anti-neoplásica para el tratamiento del carcinoma colorrectal humano por administración rectal mediante supositorios lipófilos.

25 Fórmula (g) para 100 supositorios

Composición 2	2,563
Isopropil-palmitato o estearoil polioxil-6-glicérido	1,9
Grasa endurecida	180,0

Procedimiento:

- 30 1. Agitar lentamente en un recipiente adecuado una mezcla fundida de glicéridos hidrogenados de aceite de coco a aproximadamente 35 °C, produciendo una fase dispersa homogénea.
2. Mezclar gradualmente la misma cantidad de peso de isopropil-miristato templado o estearoil-polioxil-6-glicérido a la mezcla bien homogeneizada de la **Composición 2** de acuerdo con la Tabla 1 en otro recipiente una vez producida una premezcla concentrada.
- 35 3. Agitar lentamente y añadir poco a poco la fase dispersa lipófila fundida en la premezcla homogeneizada.
4. Continuar la agitación a temperatura inferior a 35 °C durante al menos 15 minutos, a continuación, agitar todavía lentamente y dejar enfriar a temperatura entre 30 °C y 31 °C.
5. A continuación, verter la masa del supositorio con el contenido de la composición anti-neoplásica a un molde de supositorios preparados formando supositorios de alrededor de 1,8 gramos cada uno.
- 40 6. Continuar agitando la sustancia del supositorio cuando se vierte en las formas para evitar que la composición se sedimente pero que no se airee la masa fundida.

La atmósfera protectora se puede utilizar si es necesario.

45 La **Composición 2** anterior se administra como un supositorio hidrófobo en una dosis de la mañana.

La dosificación terapéutica, de diagnóstico o profiláctica específica de la composición se basa en el examen oncológico complejo del individuo particular.

50 **Ejemplo 9:** Preparación con la composición anti-neoplásica para el tratamiento del carcinoma humano de pulmón de células pequeñas por administración rectal mediante supositorios hidrófilos.

Fórmula (g) para 100 supositorios

Composición 2	2,563
n-propanol o glicerol	1,9
Polietilenglicol 300	95,0
Polietilenglicol 1500	85,0

1. Agitar lentamente en un recipiente adecuado una mezcla de masa fundida de polietilenglicol 300 y polietilenglicol 1500 a 40 °C, produciendo una fase dispersa homogénea.
2. Mezclar gradualmente la misma cantidad en peso de n-propanol o glicerol a la mezcla bien homogeneizada de la **Composición 2** de acuerdo con la Tabla 1 en otro recipiente produciendo una suspensión concentrada.
3. Agitar lentamente y añadir poco a poco la fase dispersa hidrófila fundida a la suspensión homogeneizada.
4. Continuar la agitación a temperatura inferior a 35 °C durante al menos 15 minutos, y luego dejar que se enfríe a temperatura entre 30 °C y 31 °C con agitación lenta.
5. A continuación, verter la sustancia del supositorio con la **Composición 2** anti-neoplásica a un molde de supositorios preparados de supositorios que forman alrededor de 1,8 gramos cada uno.
6. Continuar agitando la sustancia de supositorio cuando se vierte en las formas para evitar que la composición se sedimente pero que no se airee la masa fundida.

La **Composición 2** anterior de acuerdo con la Tabla 1 se administra como un supositorio hidrófilo en una dosis de la mañana, o en una media dosis de la mañana y media dosis al mediodía.

La dosificación terapéutica, de diagnóstico o profiláctica específica de la composición se basa en el examen oncológico complejo del individuo particular.

Ejemplo 10: Preparación con la **Composición 3** anti-neoplásica para el tratamiento del carcinoma pancreático humano por la administración sublingual.

Fórmula de la membrana de nanofibras (g) para 100 aplicaciones

Composición 3	3,11
Trehalosa	10,0
Glicerol al 85 % tamponado a pH 7,4	3,5
Hidroxipropilmetilcelulosa	2,2
Polietilenglicol 400	1,1
Agua redestilada	q.s.

Procedimiento:

1. Preparar una mezcla concentrada de la **Composición 3** de acuerdo con la Tabla 1 con glicerol tamponado a pH 7,4 en un recipiente adecuado.
2. Preparar la solución de trehalosa, óxido de polietileno 400 e hidroxipropilmetilcelulosa en el vehículo de agua en otro recipiente.
3. Añadir gradualmente la solución de trehalosa de acuerdo con 2 a la difusión de la Composición 3, agitar a fondo y ponerla en la tolva de suministro del dispositivo de fabricación NS WS 50 (Elmarco, Liberec, CZ).
4. La composición iónica del contenido de la tolva está optimizada para el procedimiento de electrohilado.
5. Después de la verificación de los parámetros de conductividad y procedimiento de hilado, la solución preparada a una temperatura no superior a 45 °C, produce la membrana de nanofibras que está anclada sobre la cinta de material de base.
6. En el siguiente ciclo pasar la membrana de nanofibras en un procedimiento análogo de la solución de hidroximetilpropilcelulosa y polietilenglicol 400.
7. Formar la nanomembrana de dos capas combinada de acuerdo con el peso cuadrado producido de la **Composición 3** en la membrana de nanofibras y de acuerdo con la dosis requerida, a saber, tiras de 10 cm² cada una.
8. La tira determinada para la administración única se ajusta en una parte de almacenamiento del envase adecuado.

La preparación sublingual de nanofibras se administra por la mañana y por la tarde después de la comida como película adhesiva en el lado inferior de la lengua.

La dosificación específica de la composición se basa en el examen oncológico complejo del individuo particular.

Ejemplo 11: Preparación con la **Composición 3** anti-neoplásica para el tratamiento del carcinoma pancreático humano por administración sublingual.

Fórmula de la membrana de nanofibras (g) para 100 aplicaciones

Composición 3	3,11
Manitol	10,0
n-propanol tamponado a pH 7,4	3,5
Alcohol polivinílico	2,2
Óxido de polietileno 400	1,1
Poliuretano	0,9

Agua redestilada

q.s.

Procedimiento: Análogo al Ejemplo 9. El paso del reservorio de nanofibras se realiza por electrohilado de poliuretano insoluble en agua.

- 5 La preparación de dos capas resultante se aplica por la capa protectora de poliuretano hacia la cavidad de la boca y por el reservorio de hidroxipropilmetilcelulosa de la **Composición 3** al lado sublingual.

La preparación sublingual de nanofibras se administra por la mañana y por la tarde después de la comida como película adhesiva en el lado inferior de la lengua.

- 10 La dosificación terapéutica, de diagnóstico o profiláctica específica de la composición se basa en el examen oncológico complejo del individuo particular.

- 15 **Ejemplo 12:** Preparación con una **Composición 4** anti-neoplásica para el tratamiento del carcinoma de pulmón de células pequeñas humano por administración por inhalación.

Fórmula (g) de polvo para 100 inhalaciones

Composición 4	2,73
Trehalosa	20,00
Agua para inyección	hasta 100,0

- 20 Procedimiento:

1. Resolver la cantidad en peso de la Composición 4 en 100 g de solución de agua al 20 % (peso) de trehalosa.
2. Poner un mezclador magnético en un recipiente de dispersión aislado y cubrir con la cubierta cónica con ojos de buey que se pueden cerrar.
- 25 3. Insertar una sonda ultrasónica (120 kHz) en el recipiente a través de uno de los ojos de buey y fijar el recipiente a la mesa mezcladora magnética.
4. Después de llenar el recipiente hasta el borde con nitrógeno líquido, colocar la tapa sobre el recipiente y dejar reposar el líquido.
5. Rociar aproximadamente 5 ml de la solución en la superficie de nitrógeno y cerrar la cubierta.
- 30 6. Mover 3 ml/min de solución de agua de la composición 4 anti-neoplásica y trehalosa al espacio de trabajo mediante una bomba peristáltica a través de otro ojo de buey y cambiar en el mezclador magnético.
7. Después de la dispersión, transferir las partículas sólidas producidas de la solución a los viales de vidrio transparente clase I y cerrar provisionalmente con un tapón de liofilización a temperatura normal.
8. Colocar los viales en particiones del liofilizador (GFT 6, Klein Vakuumtechnik, Niederfishbach, DE) y reducir la presión a 80 kPa.
- 35 9. Enfriar los viales gradualmente a 0 °C durante 3 horas, luego a -35 °C durante 12 horas, el secado primario se lleva a cabo por aumento de la temperatura a -10 °C durante 8 horas y a 10 °C durante 8 horas.
10. Después del aumento de la temperatura a 30 °C durante 1 hora, el secado secundario continúa a 30 °C durante 6 horas a presión 10 kPa.
- 40 11. Después de templar el producto a temperatura normal, llenar el liofilizador con aire esterilizado y cerrar los viales con el producto liofilizado.

- El polvo obtenido se prepara para el procesamiento, el llenado y la aplicación en un dosificador de polvo (p. ej., de tipo Turbhaler, Easyhaler, Novolizer, Certihaler) o como polvo presurizado (p. ej., en inhaladores tipo Ultrahaler o MAG-Haler), o en un sistema de una única dosis con cápsulas pre-ajustadas de polvo (p. ej., Spinhaler, Aerolizerk, Handihaler), o polvos en los sistemas de cápsula o blíster de dosis múltiples (p. ej. Diskhaler o Diskus).

- 50 **Ejemplo 13:** Preparación con la composición 4 anti-neoplásica para el tratamiento del carcinoma de laringe humano por administración por inhalación por medio de nebulizador.

Fórmula en polvo (g) para la nebulización de 10 dosis (g):

Composición 4	0,482 g
Trehalosa	5,50

- 55 La composición en polvo para la reconstitución por inhalación se distribuye asépticamente en diez botellas de inyección de vidrio a 100 ml mientras que el contenido de la **Composición 4** es 48,2 mg.

- Para la reconstitución, 1 botella se llena con agua para inyección o agua esterilizada. La nebulización se realiza en una membrana pequeña adecuada p. ej., basada en chorro, membrana vibratoria o nebulizador electrónico de, p. ej., tipo Spag-2, PARI LC Star, Aero-Eclipse o Pro-Dose.

60

Ejemplo 13. Preparación por administración intraperitoneal para el tratamiento del carcinoma de mama en un perro o un gato.

Fórmula (g) para 100 dosis

5

Composición 5	2,239	(véase la Tabla 1)
Trehalosa	20,00	

La fórmula anterior se procesa como una mezcla de polvo liofilizado que contiene la **Composición 5** de acuerdo con la Tabla 1 y estabilización estructural por trehalosa distribuida en 100 viales.

10

Se administra en una dosis como solución de agua eutónica-isotónica después de la reconstitución *ex tempore* de polvo seco en solución de glucosa al 5 %.

La dosificación específica de la composición se basa en el examen oncológico complejo del individuo particular.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica anti-proliferativa y anti-metastásica que contiene una mezcla de proenzimas y enzimas, **caracterizada por que** la mezcla consiste en los siguientes principios activos: proenzimas tripsinógeno y quimotripsinógeno y enzimas α -amilasa y lipasa, en donde la relación de principios activos enzimáticos, a saber, las actividades de tripsinógeno (T), quimotripsinógeno A (CH), α -amilasa B.s (A) y lipasa T.a (L) para la relación T:CH:A:L expresada en U.I. está comprendida en el intervalo de 150:150:40:1 a 400:1200:200:1, y comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para una administración simultánea, separada y posterior de la composición por vía parenteral o transmucosa, mientras que la composición es para uso terapéutico, profiláctico y anti-metastático en mamíferos.
2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** ventajosamente el tripsinógeno es de tipo I, el quimotripsinógeno es de tipo A, la α -amilasa es producida por *Bacillus sp.* y la lipasa proviene de *Triticum aestivum*.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada por que** la actividad enzimática mínima de principios activos es la siguiente: tripsinógeno 40 U.I./mg, quimotripsinógeno 60 U.I./mg, α -amilasa 20 U.I./mg y lipasa 1 U.I./mg.
4. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** la composición es para administración sistémica sublingual, rectal, por inhalación o parenteral.
5. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** contiene como excipientes farmacéuticamente aceptables: uno o más alcoholes polihídricos hidrófilos incluyendo polietilenglicol de peso molecular de 100 a 8.000, y/o alcoholes hidrófilos de bajo peso molecular como glicerol, propilenglicol, n-propanol, y/o sacáridos como trehalosa, manitol, lactosa, sorbitol, mioinositol, y/o polisorbatos como polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, poloxámeros como poloxámero 182, poloxámero 417, poloxámero 908, y/o uno o más excipientes lipófilos incluyendo triglicéridos hidrogenados como trioleato de glicerol hidrogenado, cocoato de glicerol hidrogenado, y/o ésteres de ácidos grasos superiores con glicerol o propilenglicol como glicerol-tripalmitato, glicerol-trioleato, glicerol-triesterato, glicerol-diesterato, glicerol-dioleato, glicerol-monolaurato, propilenglicol-miristato, glicerol-dipalmitoesterato, y/o ésteres de alcoholes inferiores monovalentes como diisopropil-adipato, isopropil-laurato, isopropil-linoleato, isopropil-palmitato, y/o ésteres de ácidos grasos superiores con alcoholes grasos medios y superiores, incluyendo miristil-esterato, capril-esterato, cetil-palmitato, caprin-behenato, lauril oleato, y/o alcoholes grasos superiores, incluyendo alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol palmitílico, alcohol estearílico, alcohol behenílico y ácidos grasos superiores análogos como ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico, lignocérico, araquidónico, behénico y sus derivados etoxilados como polietilenglicol 10 oleil alcohol, polietilenglicol 25 estearil alcohol, polietilenglicol 40 estearil alcohol, estearoil polietilenglicol 32 glicerol, polietilenglicol 15 hidroxí estearato y/o aceites vegetales, incluyendo aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de ricino, y sus derivados etoxilados como polioxí 35 ricinoleato, y/o fosfolípidos que incluyen lecitina de huevo, lecitina de soja, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilserina, y/o esteroides que incluyen colesterol y sus derivados como linoleato de colesterilo, acetato de colesterilo y/o polímeros biocompatibles y biodegradables, en particular poliésteres como ácido poli-DL-láctico (PDLLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-DL-láctico-glicólico (PLGA).
6. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, diseñada para una administración sublingual, **caracterizada por que** se presenta en forma de nanofibras, mientras que contiene al menos uno de los polímeros polivinílicos como polivinilpirrolidona de peso molecular de aprox. 30.000 a 50.000 y alcoholes polivinílicos de peso molecular de 20.000 a 200.000, de derivados de celulosa como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y/o polisacáridos de tipo almidón como hidroxietilalmidón, sal sódica de carboximetilalmidón y/o dextrinas de peso molecular de 4.000 a 80.000, y/o polisacáridos biotecnológicos de tipo dextrano de peso molecular de 10.000 a 80.000, y/o sustancias de tipo glucuronato como mucílago de xantano, y/u otros poliuronidos o sus sales, en particular de sodio, de potasio, similares a hialuronanos, alginanos, pectinanos, arabinanos y/o polímeros a base de ácidos acrílicos, metacrílicos y/o sus copolímeros como polímeros de carboxivinilo (carbómeros) reticulados con polialquénil éteres de azúcares o polialcoholes (como dialil sacarosa, dialilpentaeritritol, poliésteres biodegradables de α -hidroxiácidos como (PDLLA), (PGA), (PLGA), policaprolactonas de peso molecular de 10.000 a 100.000, otros excipientes poliméricos de tipo copolímero como polivinilcaprolactama-polivinilacetato de polietilenglicol.
7. Composición farmacéutica o su parte de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 diseñada para la administración por inhalación, **caracterizada por que** contiene al menos uno o más sacáridos, incluyendo trehalosa, manitol, glucosa y/o diversas formas de lactosa.

8. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada por que** se presenta en forma de preparación estabilizada por nanofibras para la administración directa de los principios activos o como almacenamiento estabilizado de principios activos en un producto intermedio o en la preparación final.

Fig. 1: Fotodocumentación de un ensayo *in vivo* en ratones *nu/nu* con línea de carcinoma de mama MDA-MB-231 en el día 36 de la administración rectal de la composición K2 (dosis 2, vehículo lipófilo) en comparación con el ratón de referencia (sin administración)

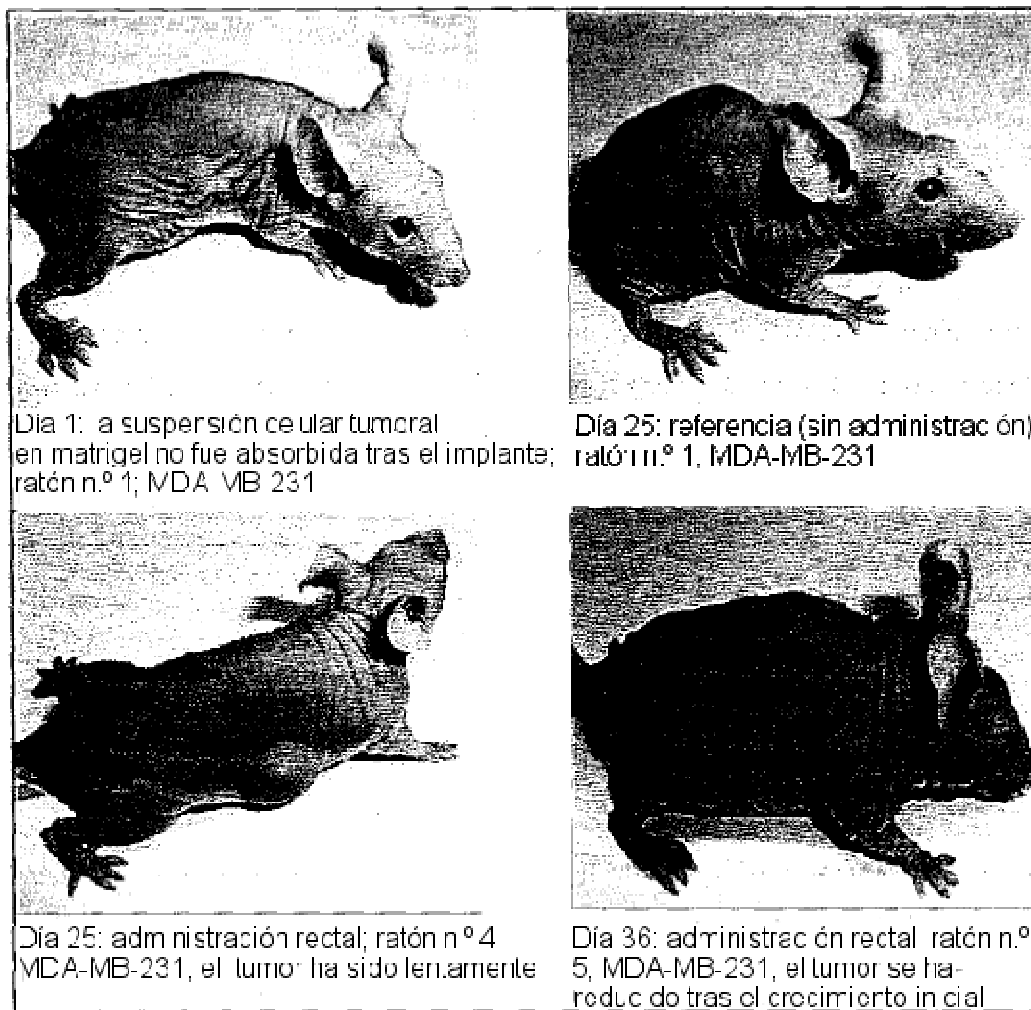


Fig. 2: Los valores medios de los volúmenes tumorales (incluyendo DT) durante un ensayo in vivo de 40 días con línea MDA-MB-231 en administración subcutánea y rectal de la composición anti-neoplásica 2 (ratones nu/nu hembra; aprox. 28 g; 8 ratones en cada grupo; la dosis 2 contiene una cantidad doble de la composición 2).

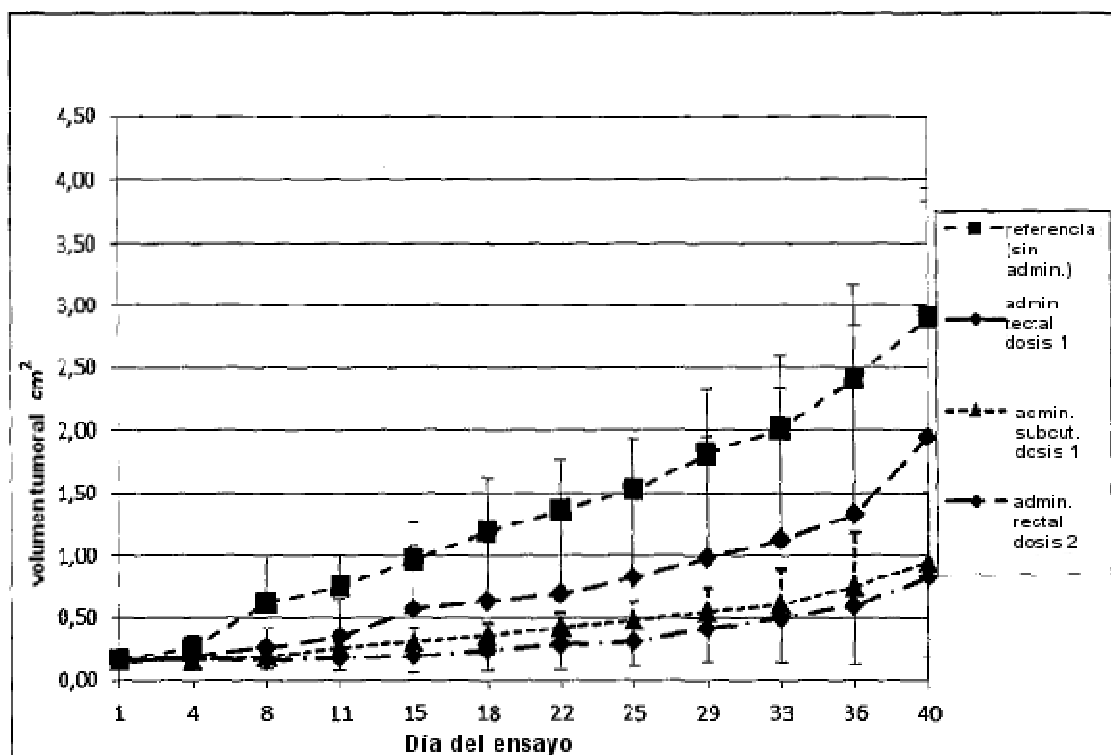


Fig. 3: La fotodocumentación del primer tercio del ensayo in vivo en ratones nu/nu con línea H 116 de carcinoma colorrectal en cada administración diaria de la composición 2 (dosis 1; base lipófila) en comparación con el ratón de referencia (sin administración).

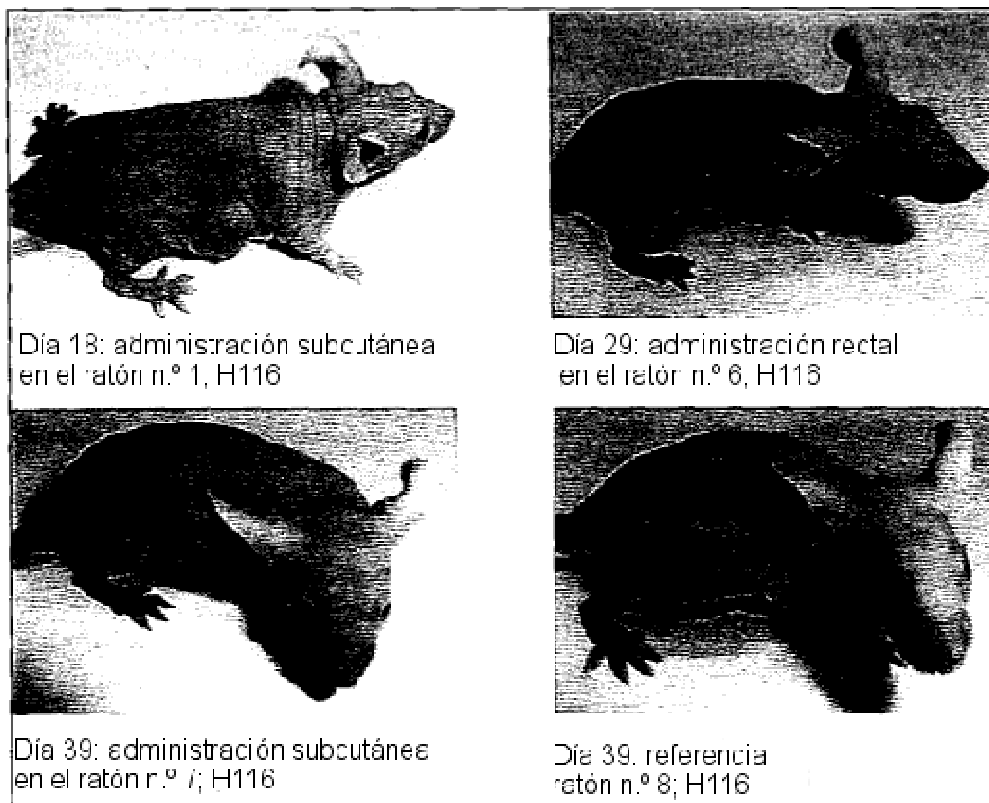


Fig. 4: Valores medios de los volúmenes tumorales (incluyendo DT) hasta el 23^{er} día del ensayo in vivo en ratones nu/nu con línea de carcinoma colorrectal H116 en administración subcutánea y rectal de la composición anti-neoplásica K1 (K2) (ratones nu/nu hembra; aprox. 28 g, 8 ratones en cada grupo).

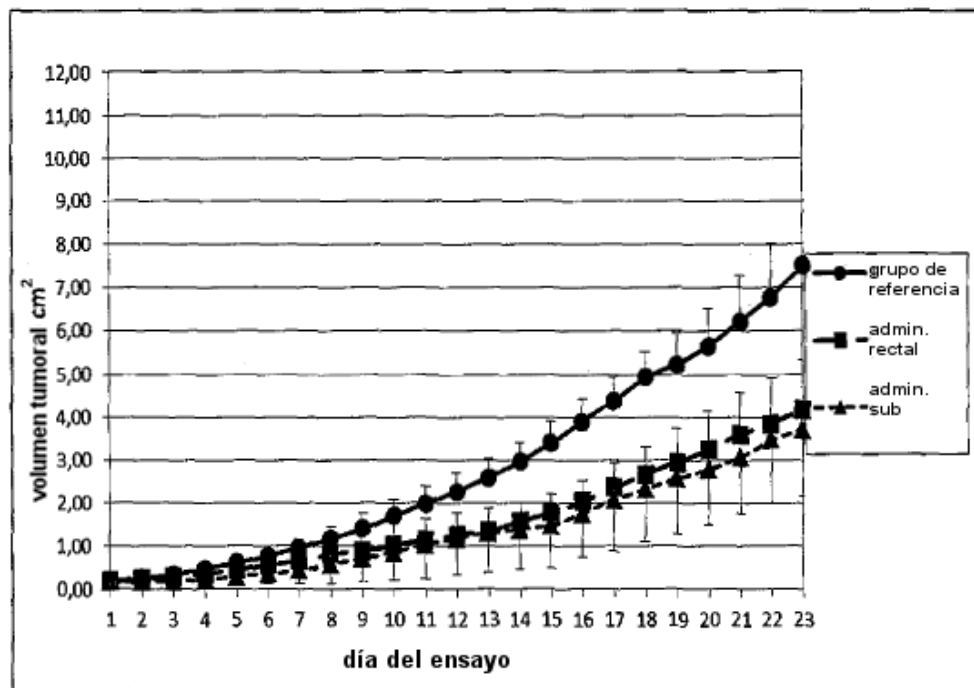


Fig. 5: Fotodocumentación de un ensayo in vivo con una línea de carcinoma pancreático CAPAN 2 en ratones nu/nu en el día 85 de administración rectal subcutánea de la composición K2 en comparación con el ratón de referencia (sin administración).

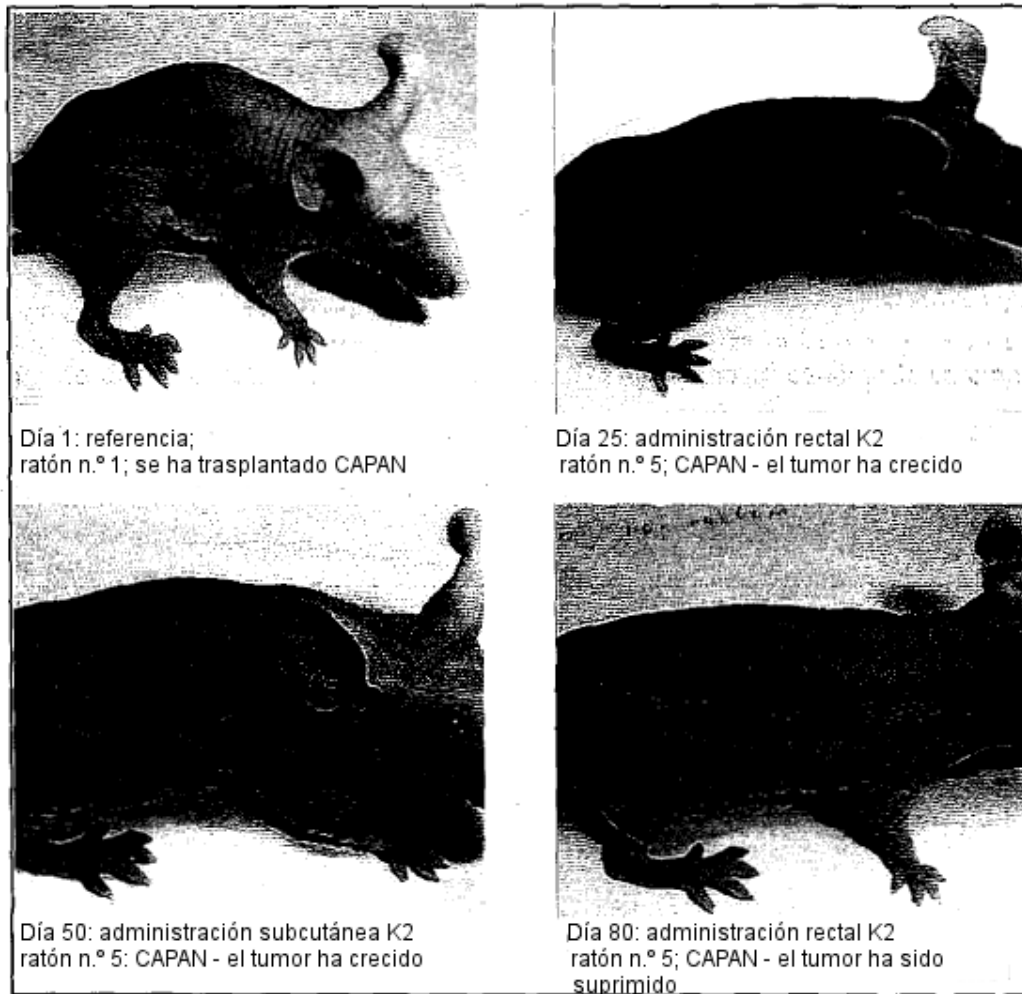


Fig. 6: Valores medios de volúmenes tumorales (incluyendo DT) en un ensayo in vivo en ratones nu/nu con línea de carcinoma pancreático CAPAN 2 en administración subcutánea y rectal diaria de una composición anti-neoplásica K1 o K2 (ratones nu/nu hembra; aprox. 28 g; 8 ratones en cada grupo).

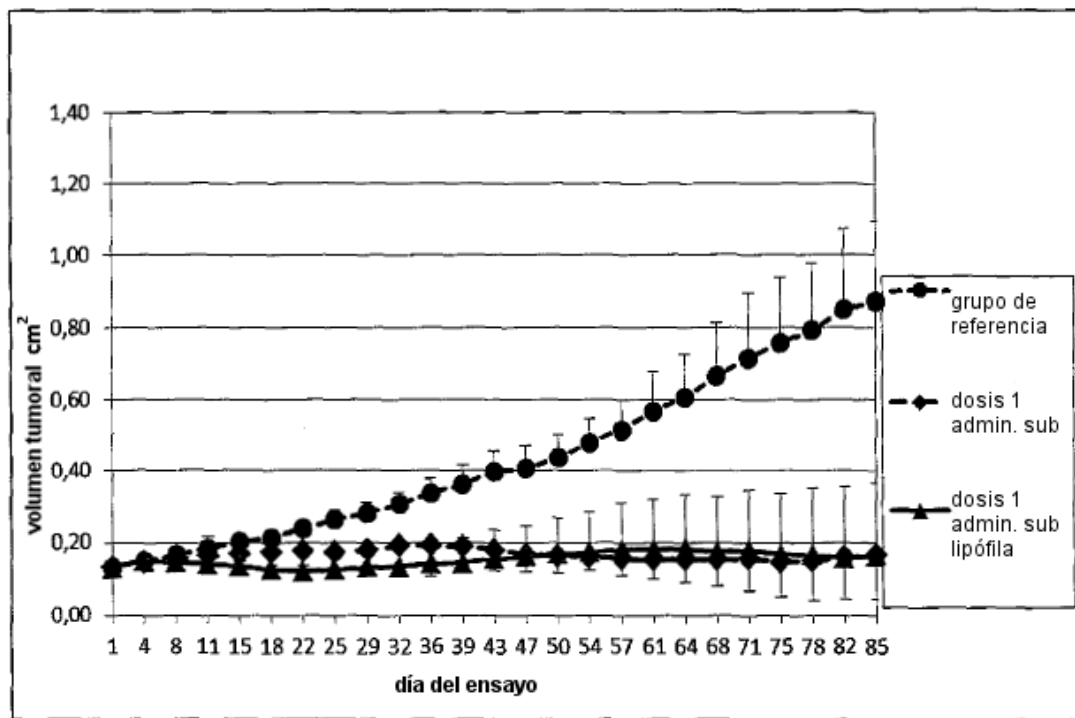


Fig. 7: Fotodocumentación del ensayo in vivo en el día 75 (día 99) con una línea A549 de carcinoma de pulmón de células pequeñas en ratones nu/nu en administración rectal diaria de la composición 2 (base hidrófila, dosis 2) en comparación con el ratón de referencia (sin administración).

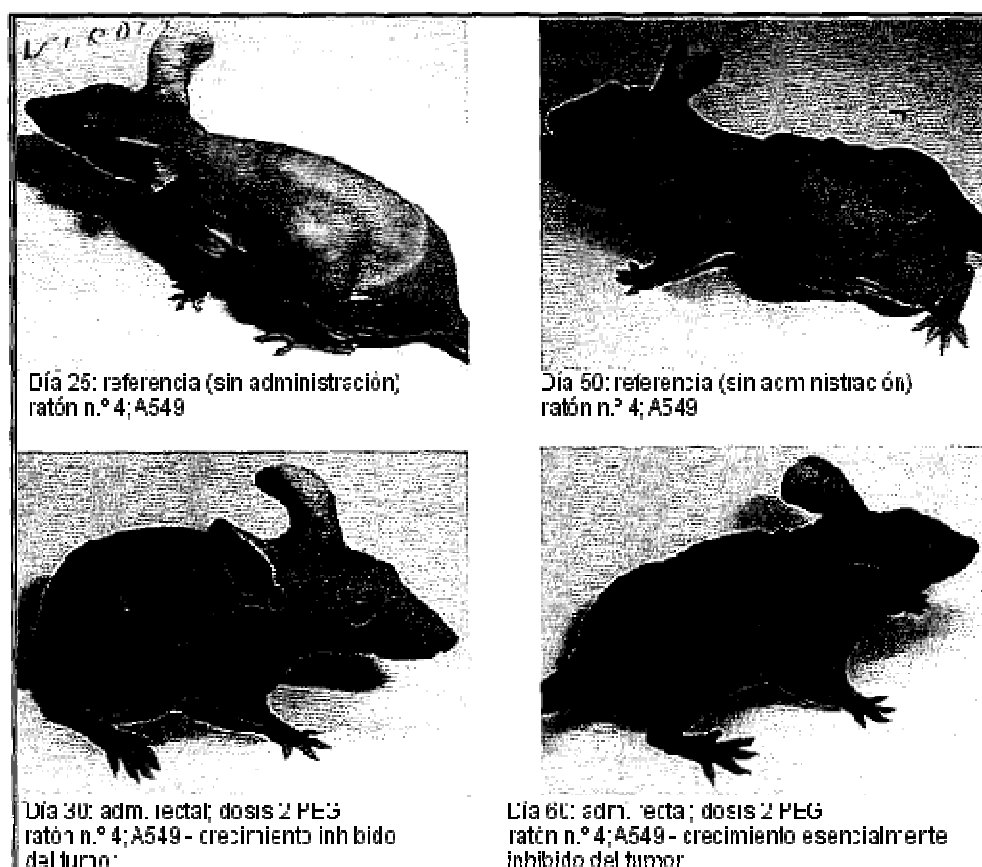


Fig. 8: Valores medios de volúmenes tumorales (incluyendo DT) en un ensayo in vivo en el día 75 (día 99) en ratones nu/un con línea A549 de carcinoma de pulmón de células pequeñas en administración subcutánea y rectal diaria de una composición anti-neoplásica K1, resp. K2 (ratones nu/nu hembra; aprox. 28 g; 8 ratones en cada grupo; la dosis 2 tiene el doble de la cantidad de la dosis 1).

