



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 205**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02806416 .0**

96 Fecha de presentación : **24.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1459738**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54

Título: **Composición farmacéutica con propiedades trombolíticas, antiinflamatorias y citoprotectoras.**

30

Prioridad: **26.12.2001 RU 2001135876**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2011

73

Titular/es: **Scientific Future Management SFM
ul. Sofiiskaya, D.20
630056 Novosibirsk, RU**

72

Inventor/es: **Artamonov, Andrei Vladimirovich;
Vereschagin, Evgeny Ivanovich;
Grishin, Oleg Vitalievich y
Troitsky, Alexandr Vasilievich**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 205 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 con propiedades trombolíticas, antiinflamatorias y citoprotectoras.

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a medicina, particularmente a farmacología y fármacos en base a preparaciones enzimáticas, y puede utilizarse en terapia compleja para tratar enfermedad isquémica del corazón, accidente isquémico cerebral, procesos reumatoideos y otras enfermedades acompañadas por fenómenos isquémicos, trombóticos y de inflamación no específica.

10 La presente invención abarca el campo de hidrólisis enzimática de proteínas trombogénicas, principalmente fibrina, proteína formadora de estructura de todos los trombos, independientemente de la ubicación y tamaño de los péptidos. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos que contienen enzimas proteolíticas que poseen propiedades fibrinolíticas, inmovilizadas en (unidas a) polímeros hidrófilos solubles en agua. La invención también está asociada a métodos para utilizar dichos compuestos para terapia fibrinolítica en el tratamiento de infartos agudos del miocardio, accidente isquémico cerebral, y también a métodos terapéuticos dirigidos a la corrección (mejora) de características hemorreológicas en el tratamiento de lesiones isquémicas de órganos y tejidos de
15 diferente etiología, incluyendo microtrombosis.

Estado de la técnica

20 Existen diversas preparaciones médicas conocidas en la técnica utilizadas para tratar enfermedad isquémica del corazón y accidente isquémico cerebral. Como norma, en la etapa final de estas enfermedades el principal factor patogénico es la trombosis intravascular. En la práctica médica actual las preparaciones trombolíticas se han vuelto ampliamente utilizadas como medios de terapia etiológica para tratar infartos agudos del miocardio y accidente isquémico cerebral. Existen preparaciones farmacéuticas conocidas, tales como estreptasa, estreptoquinasa, activador de plasminógeno de tejidos (alteplasa) y fibrinolisisina (Methodological Recommendations for Carrying out Early Therapeutic Measures in Patients with Acute Myocardial Infarction, Communication of the American Cardiology College and American Heart Association. V.N. Ganyukov (Ed.), Collection of Papers, Novosibirsk, 1998, página 100 (traducción en ruso)). Todas estas preparaciones, directamente o como resultado de la activación del sistema anticoagulante de la sangre, actúan sobre la fibrina, llevando a su destrucción y, en consecuencia, a la lisis del trombo intravascular. A pesar de su alta efectividad terapéutica, estas preparaciones poseen un pronunciado efecto colateral, a saber, pueden inducir hemorragias incontrolables y peligrosas, debido a la disminución del sistema coagulante de sangre (Saunders W.B. Indications for Fibrinolytic Therapy Trialists Collaborative Group.//Lancet Ltd., 30 1994, vol. 343, páginas 311-322). Además, para dichas preparaciones como estreptoquinasa y alteplasa es difícil seleccionar una dosificación terapéutica adecuada debido a la existencia de una actividad antiséptica individual a estreptococos en el organismo humano, que lleva a la inactivación de estas preparaciones.

35 Se conocen preparaciones medicinales que son capaces de disminuir la reacción inflamatoria. Las preparaciones más divulgadas de estas preparaciones son las preparaciones antiinflamatorias no esteroideas, tales como aspirina, indometacina, diclofenac sódico, y otros (Nasonov E.L., Tsvetkova V.S., and Tov N.L., Selective inhibitors of cyclooxygenase- 2: new plospects of treating human diseases //Ter. Arkhiv, 1998, No. 5, páginas 8-14 (en ruso)). Las preparaciones farmacéuticas conocidas no están libres de desventajas esenciales: pueden causar lesiones del estómago con el desarrollo de gastropatía no esteroide, hemorragias y ulceraciones de la mucosa del tracto gastrointestinal.

40 El documento WO 93/20838 está dirigido a compuestos para hidrolizar selectivamente proteínas de materia pionicrótica que comprende una proteasa activa unida a geles hidrófilos o a geles en combinación con polímeros solubles en agua.

45 La publicación Archives of Pharmacal Research Vol. 24, No. 3, 229-233, 2001 trata el desarrollo de una tecnología para fabricar un gel hidrófilo de recepción de óxido de polietileno en el que la capacidad de radiación se emplea para causar la reticulación de polímeros en una solución acuosa.

En Radiation Physics and Chemistry, Vol. 48, No. 6, páginas 795-797, 1996 se desvela la posibilidad del uso de un haz de electrones para la inmovilización de proteasas en óxido de 1,4-polialquileno para obtener un complejo biológicamente activo para uso multipropósito.

50 La publicación en Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 9, No. 3, páginas 231-241, 1984 desvela el uso de tecnología de radiación ionizante a enzimas unidas a un compuesto polimérico mediante la creación de grupos reactivos en este último.

En Enzym Engineering, Plenum Press, New York, No. 5, páginas 423-426, 1980, se desvela la termoestabilidad de subtilisinas solubles e inmovilizadas después de su modificación por dextranos y dextrinas.

Se conocen preparaciones farmacéuticas, que poseen propiedades citoprotectoras, tales como preductal (efecto cardioprotector) y bloqueadores de los receptores de H₂ (gastrozepina, ranitidina). Las preparaciones conocidas poseen un efecto citoprotector débil y demuestran presentar acción farmacológica en la administración prolongada (Brottier L., Barat J.L., Combie C. et al., Therapeutic value of a cardioprotective agent in patients with severe ischaemic cardiomyopathy //Eur. Heart J., 1990, vol. 11, páginas 207-212).

En la actualidad no puede encontrarse ningún dato en la literatura científica y médica con respecto a la provisión de composiciones farmacéuticas que producen efecto sinérgico mutipropósito en las principales relaciones patogénicas de isquemia, inflamación y trombosis en combinación con propiedades citoprotectoras.

Se informaron diferentes métodos para la inmovilización de enzimas, incluyendo proteasas, en un número de vehículos poliméricos. Por ejemplo, en el trabajo por R.I. Salganik et al. "Immobilized Proteolytic Enzymes in Treating Purulent Processes", Novosibirsk, páginas 3-8, 1981 (en ruso) se describe un método para tratar heridas purulentas, abscesos y flegmones con la ayuda de enzimas proteolíticas unidas covalentemente a gránulos sólidos de celulosa. El uso de polímeros líquidos con proteasas unidas es descrito por O.A. Peretyagin et al. en "Oftalmologiya", 1987, No. 3, páginas 145-148 y por Gonchar et al. en "Veterinariya", 1989, No. 4, páginas 52-55. En la mayoría de los casos se utilizó un reactivo químico bifuncional como agente de unión, en el que un grupo químico se unió al residuo de aminoácido de la proteína enzimática, mientras otro grupo reactivo se unió al vehículo polimérico. Se investigó un número de procedimientos químicos para la unión covalente de diversas proteínas a vehículos sólidos. Sin embargo, las proteasas unidas a gránulos sólidos o fibras no pueden utilizarse para tratar lesiones o enfermedades que llevan a trombosis intravascular y están acompañadas por cambios negativos de hemorreología en el canal microcirculatorio de tejidos y órganos.

Por ello, se requieren compuestos que efectivamente hidrolicen las proteínas, predominantemente aquellas responsables de trombosis en vasos sanguíneos de diferentes diámetros, que constituyen un factor etiológico del desarrollo de enfermedades tales como infarto agudo del miocardio y accidente isquémico cerebral. En la actualidad dichos compuestos que contienen trombolíticos no tóxicos y sustancias con funciones correctivas hemorreológicas no han sido sintetizados para la terapia compleja de enfermedad isquémica del corazón, enfermedad hipertensiva y enfermedades reumatoideas. También se requieren métodos simples, no costosos y convenientes para unir simultáneamente las proteasas a un complejo de vehículos poliméricos y proporcionar la esterilización del producto final. Los métodos ideales son aquellos que pueden proporcionar compuestos que poseen diferente viscosidad y estado de agregación, apropiados para diferentes propósitos y diferentes formas de administración.

Esencia de la invención

La investigación presentada en la presente memoria cumple con los requerimientos arriba mencionados y también ofrece ventajas relativas sobre otras preparaciones medicinales y métodos para preparar composiciones farmacéuticas que ofrecen un efecto terapéutico sinérgico complejo en diversas relaciones de la patogénesis de enfermedad isquémica del corazón. La investigación presentada, la composición farmacéutica reivindicada, y los métodos para preparar la misma aseguran la obtención de alto efecto terapéutico en el tratamiento de procesos inflamatorios no específicos que se deben a efectos citoprotectores, trombolíticos y antiisquémicos.

La invención propuesta está dirigida a la provisión de composiciones para la hidrólisis selectiva de proteínas trombogénicas, que consisten en proteasas activas unidas a una combinación de polímeros hidrófilos solubles en agua. Dichas composiciones consisten predominantemente en subtilisinas inmovilizadas en polímeros hidrófilos.

La presente invención contribuye al desarrollo de métodos para fabricar dichas composiciones mediante la unión de las proteasas a polímeros solubles en agua para producir una mezcla y simultáneamente esterilizar dicha mezcla por irradiación, particularmente con la ayuda de una corriente de electrones acelerados o radiación gamma, así como otras clases de radiación ionizante, incluyendo fuentes de radiación por láser.

La invención propuesta está dirigida a nuevas composiciones farmacéuticas según lo que se define en las reivindicaciones para la hidrólisis de proteínas trombogénicas, que consisten en proteasas activas unidas a polímeros hidrófilos. Dichas composiciones son útiles para la eliminación de trombos que comprenden fibrina y otras formaciones. La invención propuesta también está dirigida a nuevos compuestos para corregir cambios patológicos en tejidos y órganos, originados como resultado de trombosis e isquemia, así como a la corrección de reacciones inflamatorias no específicas, y como un medio auxiliar para tratar y prevenir gastropatías que se desarrollan como resultado de la administración de preparaciones antiinflamatorias no esteroides. Las proteasas inmovilizadas en polímeros hidrófilos en conformidad con la invención degradan selectivamente proteínas trombogénicas, principalmente fibrina, mientras las células vivas y proteínas funcionalmente activas permanecen intactas y sin daños. Para la hidrólisis efectiva de las proteínas de masas trombóticas, es preferible tener una mezcla polifuncional de proteasas que son capaces de reconocer e hidrolizar diversos enlaces peptídicos. Las proteasas naturales incluyen, por ejemplo, subtilisina, tripsina, quimiotripsina, papaína y otras enzimas de origen animal y bacteriano, que poseen actividad fibrinolítica y proteolítica.

Aunque las proteasas son obtenibles de cualquier fuente, incluyendo fuentes animales y vegetales, las proteasas bacterianas son especialmente preferibles. En comparación con otros tipos de proteasas, las proteasas bacterianas son usualmente menos costosas y están disponibles en cantidades ilimitadas. Las proteasas bacterianas preferibles de la invención propuesta pueden producirse mediante *Bac subtilis* y son conocidas como subtilisinas. Es preferible una mezcla de subtilisinas neutras y/o alcalinas, debido a que la mezcla puede degradar selectivamente una variedad de enlaces peptídicos y conservar la actividad a pH de 6,0 a 10,0.

Las proteasas en conformidad con la invención propuesta están unidas a una combinación de polímeros solubles en agua que actúan como vehículos para las enzimas proteolíticas. Los polímeros solubles en agua son óxido de polietileno (PEO), sinónimo: polietilenglicol (PEG), que posee un peso molecular de 1500 kDa (PEO- 1500), y dextrano que posee un peso molecular de 30-40 kDa. Los óxidos de polietileno y dextranos que poseen un peso molecular más pequeño o mayor también pueden utilizarse en vez de o junto con PEO- 1500 y dextrano que poseen un peso molecular de 30-40 kDa. Otros polímeros solubles en agua apropiados y sus combinaciones que también pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, y similares.

Las composiciones en conformidad con la invención propuesta pueden estar en cualquier forma sólida o no sólida o en una combinación de formas de agregación. Es preferible utilizar polvos liofilizados (sustancias) en diversas combinaciones con polímeros solubles en agua como composiciones, dependiendo del campo en el que el compuesto está previsto para ser utilizado.

Para la provisión de propiedades terapéuticas generales, pueden añadirse anticuerpos, desinfectantes terapéuticos, glucocorticoides, estimuladores de regeneración de tejido, y otros agentes terapéuticos a la composición dada. Para el beneficio del caso a disposición, dichos agentes no deben mezclarse en una cantidad considerable con las proteasas, a menos que su efecto en la actividad terapéutica y específica de la composición farmacéutica reivindicada haya sido respaldado con pruebas circunstanciales (investigado).

La presente invención también está dirigida a métodos para preparar composiciones según lo que se define en las reivindicaciones mediante la unión de proteasas a polímeros solubles en agua y esterilización simultánea de la mezcla por radiación. Las clases preferibles de radiación son electrones acelerados o radiación gamma.

En resumen, la tecnología es la siguiente: una solución de una mezcla de proteasas, preferiblemente subtilisinas, y polímeros solubles en agua, a saber óxido de polietileno y dextrano, se somete a la acción de electrones emitidos por un acelerador electrónico en una dosis que promueve la unión de las mismas a un vehículo polimérico y simultáneamente esteriliza el compuesto obtenido. Por otra parte, pueden utilizarse rayos gamma emitidos por Co^{60} en vez de un haz de electrones con la provisión de la unión y esterilización de los componentes. Una dosis de radiación suficiente puede ser seleccionada por una persona experta en la técnica mediante el cálculo de las condiciones para la provisión de esterilidad a la mezcla y efecto no esencial en la actividad proteolítica de las enzimas.

Finalmente, la invención propuesta también está dirigida a métodos para limpiar el lecho vascular de los trombos mediante el control o utilización de cantidades efectivas de la composición reivindicada para la eliminación de este material. Las composiciones en conformidad con la presente invención son efectivas cuando se utilizan como preparaciones para fines farmacéuticos en diversos modos y campos, tales como medicina, estomatología, medicina veterinaria, y cuidado personal.

En este sentido, las composiciones en conformidad con la presente invención son particularmente aptas para tratar enfermedad isquémica del corazón y sus complicaciones, así como accidente isquémico cerebral, enfermedades reumatoideas y otras patologías, en cuyas patogénesis hay una reacción inflamatoria, isquemia de tejidos, alteraciones de la hemorreología y la microcirculación vascular debido a trombosis. La composición farmacéutica reivindicada también es apropiada para la destrucción enzimática de fluidos biológicos viscosos, tales como mucosas segregadas (por ejemplo, secreción bronquial), por ello es efectiva en el tratamiento de enfermedades pulmonares para la prevención y tratamiento de obstrucción bronquial. La composición farmacéutica reivindicada también es aplicable para la destrucción enzimática de proteínas y péptidos de tejidos necróticos que siempre están presentes en procesos infecciosos inflamatorios y traumáticos. Por ello esta composición también es efectiva en el tratamiento de enfermedades proinflamatorias de diferente etiología y localización.

Estas composiciones pueden aplicarse en el lugar de la lesión mediante cualquier método conocido en la medicina. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, administración parenteral, uso intracavitario y externo, pulverización en aerosol, jeringado a través de trocar, catéteres, broncoscopio, u otro uso apropiado. El método de administración dependerá, al menos parcialmente, de la naturaleza del área de lesión y del tipo y cantidad de tejidos necróticos o trombogénicos que deben ser eliminados. El método de administración predominante es la administración parenteral de la preparación (composiciones).

Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1** demuestra las propiedades trombolíticas de la composición reivindicada, investigada en un modelo de trombólisis in vitro.

5 La composición reivindicada en la dosis terapéutica estándar de 50 unidades fisiológicas/ml (50 PhU/ml) con seguridad supera a la fibrinolisis ($p < 0,02$); tripsina ($p < 0,01$); y trombólisis espontánea en solución fisiológica ($p < 0,01$).

10 La **Fig. 2** demuestra que las propiedades trombolíticas de la composición reivindicada se conservan a medida que la "edad" del trombo se incrementa en 7 días. La fibrinolisis no actúa en el trombo de 7 días. Durante las primeras dos horas la acción de la fibrinolisis no difiere con certeza de la lisis espontánea de fondo en solución fisiológica. Por el final de la cuarta hora la composición reivindicada disuelve el trombo completamente, mientras la fibrinolisis lisa solamente el 20% de la masa del trombo "viejo".

15 La **Fig. 3** demuestra las propiedades antiinflamatorias de la composición reivindicada, investigada en la inducción estimuladora modelo de un mediador de inflamación – factor de necrosis tumoral (α TNF) en ratones de línea CBA con accidente endotóxico. La actividad del α TNF se midió mediante la utilización de células lineales L929 y se expresó en unidades de actividad (AU):

1 - actividad de α TNF en animales intactos;

2 - actividad de α TNF en animales después de la administración de endotoxina;

20 3 - actividad de α TNF en animales a los que se administró la composición reivindicada una hora antes de la administración de endotoxina. Tal como se observa, la composición reivindicada reduce 50 veces la actividad de α TNF.

25 La **Fig. 4** demuestra las propiedades citoprotectoras de la composición reivindicada, estudiada en el modelo de miocarditis por adrenalina en ratas. Se presentan los datos de las investigaciones morfométricas histológicas del volumen de necrosis y cambios distrofosicos en el miocardio de las ratas. El volumen de lesiones se determinó planimétricamente y se expresó en porcentaje de la densidad de volumen que es igual a la relación volumen de lesiones/valor total de tejido multiplicada por 100%.

Los animales de control K necr. a los que después de administrarles adrenalina se les administró 1 ml de solución isotónica de NaCl por vía intraperitoneal dos veces por día.

Los animales experimentales TRB necr. a los que después de administrarles adrenalina se les administró 1 ml de la composición reivindicada por vía intraperitoneal dos veces por día.

30 Las primeras dos columnas demuestran el efecto positivo de la composición reivindicada (aproximadamente reducción de 1,5 veces del número de necrosis en el músculo cardíaco) al final del tercer día de tratar los animales.

Las siguientes dos columnas demuestran el efecto positivo de la composición reivindicada (aproximadamente reducción de 2,5 veces del número de cambios distróficos en el músculo cardíaco) al final del séptimo día de tratar los animales.

35 Los Ejemplos que siguen tienen como objetivo ilustrar la formulación, el método de preparación y las propiedades farmacológicas de la composición reivindicada, pero no se limitan a la invención propuesta.

Realizaciones preferentes de la invención**Ejemplo 1**

La composición farmacéutica propuesta se prepara de la siguiente manera:

40 se prepara una mezcla de reacción mediante la disolución de protosubtilina, predominantemente protosubtilina G3Kh y óxido de polietileno (PEO) que posee un peso molecular de 400-20000 Da (predominantemente 1500 Da) en una solución de dextrano que posee un peso molecular de 40-70 kDa (predominantemente 40 kDa) en un solución tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 7,5-8,2. La mezcla obtenida se purifica mediante la eliminación de proteínas de lastre por precipitación con sal y posterior filtración. La solución resultante se somete a irradiación con rayos gamma o una corriente de electrones acelerados (con energía de 2,0 MeV) en una dosis de 0,5-1,5 Mrad. La solución después de la irradiación se somete a filtración esterilizante y se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml. Después la solución se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no excede el 2%.

Como resultado, se obtiene una composición que contiene un complejo proteasa de *Bac. subtilis*, inmovilizado en óxido de polietileno y dextrano. La actividad proteolítica de la composición obtenida en un vial es de 500 a 1000,0 unidades proteolíticas por gramo (PU/g). La composición comprende una masa homogénea porosa levemente amarillenta.

Para fines terapéuticos se utiliza una solución de la composición reivindicada (siendo la denominación condicional de la misma "Trombovazim"), que se prepara en forma extemporánea mediante la disolución de los contenidos de un vial en 10 ml de solución isotónica estéril de cloruro de sodio o en 10 ml de agua para inyecciones.

Ejemplo 2

- 5 La composición reivindicada puede prepararse mediante otro método, a saber, mediante la preparación en forma separada de un componente activo (componente (1)) que contiene un complejo de proteasas inmovilizadas en óxido de polietileno y dextrano, y un disolvente que es una solución de óxido de polietileno (componente (2)). La formulación de dos componentes de la composición hace posible variar la actividad de la composición farmacéutica reivindicada mediante la variación de la relación componente activo/disolvente, de manera que pueden seleccionarse esquemas individuales para tratar. La composición de dos componentes se prepara de la siguiente manera:

Componente (1) (sustancia activa)

- 15 La mezcla de reacción se prepara mediante la disolución de protosubtilina (predominantemente protosubtilina G3Kh) y óxido de polietileno (PEO) que posee un peso molecular de 400-20000 Da (predominantemente 1500 Da) en una solución de dextrano que posee un peso molecular de 70-40 kDa (predominantemente 40 kDa) en una solución tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 7,5-8,2. La mezcla obtenida se purifica mediante la eliminación de proteínas de lastre por precipitación con sal y posterior filtración. La solución resultante se somete a irradiación con rayos gamma o una corriente de electrones acelerados (con energía de 2,0 MeV) en una dosis de 1,0 Mrad. La solución después de la irradiación se somete a filtración esterilizante y se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml. Después la solución se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no exceda el 2%.

- 20 Como resultado, se obtiene el componente (1) de la composición, cuyo componente contiene un complejo proteasa de *Bac. subtilis*, inmovilizado en polietileno y dextrano. La actividad proteolítica de la composición obtenida es de 500 a 1000,0 PU/g. El componente (1) comprende una masa homogénea porosa levemente amarillenta.

Componente (2) (disolvente)

- 25 Se prepara una solución de óxido de polietileno (predominantemente óxido de polietileno con un peso molecular de 1500 Da) en una solución tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 7,5-8,2. La solución obtenida se somete a irradiación con rayos gamma o una corriente de electrones acelerados (con energía de 2,0 MeV) en una dosis de 1,0 Mrad. La solución después de la irradiación se somete a filtración esterilizante y se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml.

- 30 Como resultado, se obtiene un disolvente estéril para el componente (1) de la composición reivindicada. El disolvente comprende un líquido levemente amarillento.

Para fines terapéuticos se utiliza una solución de la composición reivindicada (siendo la denominación condicional de la misma "Trombovazim"), que se prepara en forma extemporánea mediante la disolución de los contenidos de un vial con el componente (1) que contiene proteasas inmovilizadas en 10 ml del componente (2) (disolvente).

- 35 La disolución extemporánea del Componente (1) en el disolvente (componente (2)) da la composición farmacéutica reivindicada.

Ejemplo 3

- 40 Se disuelven 15 de óxido de polietileno PEO-1500 en 300 ml de una solución al 10% de dextrano que posee un peso molecular de 40 kDa en un tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 7,5, se añaden 6,3 g de protosubtilina G3Kh, se agita la mezcla a una temperatura de 18-20°C durante 30 minutos. Después las proteínas de lastre se precipitan mediante técnicas de precipitación con sal. Para realizar ello, se añaden a la mezcla en sucesión hasta disolución completa 1,3 g de fosfato de sodio disustituido hasta una concentración final de 0,45% y 1,9 g de cloruro de calcio hasta una concentración final de 0,63%. Después de la disolución de cloruro de calcio se forma un precipitado insoluble de fosfato de calcio en la mezcla de reacción, y este fosfato de calcio adsorbe las proteínas de lastre. La mezcla se mantiene durante 12 horas a una temperatura de 4 a 8°C para la completa precipitación de las proteínas de lastre. Después de esto la mezcla de reacción se filtra a través de filtros de papel ("cinta blanca"). El volumen del filtrado es 300 ml. La solución obtenida se somete a irradiación gamma en una dosis de 1,0 Mrad. Después de la irradiación la solución se somete a filtración esterilizante, se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml y se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no exceda el 2%. Como resultado, se obtiene una

composición, que posee la siguiente formulación en porcentaje en peso:

- | | | |
|---|----|---|
| | 1. | Protosubtilina G3Kh2,1 |
| | 2. | Dextrano (peso molecular 40 kDa) 10,0 |
| | 3. | Óxido de polietileno PEO-15005,0 |
| 5 | 4. | Tampón de fosfato de sodio 0,025 M 82,9 |

La actividad proteolítica de la composición es 850 PU/g.

Ejemplo 4

Se disuelven 15 de óxido de polietileno PEO-1500 en 300 ml de una solución al 5% de dextrano que posee un peso molecular de 40 kDa en un tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 8,2, se añaden 6,0 g de protosubtilina G3Kh, se agita la mezcla a una temperatura de 18-20°C durante 30 minutos. Después se precipitan las proteínas de lastre mediante técnicas de precipitación con sal. Para realizar ello, se añaden a la mezcla en sucesión hasta disolución completa 1,3 g de fosfato de sodio disustituido hasta una concentración final de 0,45% y 1,9 g de cloruro de calcio hasta una concentración final de 0,63%. Después de la disolución de cloruro de calcio se forma un precipitado insoluble de fosfato de calcio en la mezcla de reacción, y este fosfato de calcio adsorbe las proteínas de lastre. La mezcla se mantiene durante 12 horas a una temperatura de 4 a 8°C para la completa precipitación de las proteínas de lastre. Después de eso la mezcla de reacción se filtra a través de filtros de papel ("cinta blanca"). El volumen del filtrado es 300 ml. La solución obtenida se somete a radiación gamma en una dosis de 1,0 Mrad. Después de la irradiación la solución se somete a filtración esterilizante, se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml y se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no exceda el 2%. Como resultado, se obtiene una composición, que posee la siguiente formulación en porcentaje en peso:

- | | | |
|--|----|---|
| | 1. | Protosubtilina G3Kh2,0 |
| | 2. | Dextrano (peso molecular 40 kDa)5,0 |
| | 3. | Óxido de polietileno PEO-15005,0 |
| | 4. | Tampón de fosfato de sodio 0,025 M 88,0 |

La actividad proteolítica de la composición es 800 PU/g.

Ejemplo 5

Se disuelve 0,5 de óxido de polietileno PEO-1500 en 300 ml de una solución al 10% de dextrano que posee un peso molecular de 40 kDa en un tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 8,2, se añaden 5,7 g de protosubtilina G3Kh, se agita la mezcla a una temperatura de 18-20°C durante 30 minutos. Después se precipitan las proteínas de lastre mediante técnicas de precipitación con sal. Para realizar ello, se añaden a la mezcla en sucesión hasta disolución completa 1,3 g de fosfato de sodio disustituido hasta una concentración final de 0,45% y 1,9 g de cloruro de calcio hasta una concentración final de 0,63%. Después de la disolución de cloruro de calcio se forma un precipitado insoluble de fosfato de calcio en la mezcla de reacción, y este fosfato de calcio adsorbe las proteínas de lastre. La mezcla se mantiene durante 12 horas a una temperatura de 4 a 8°C para la completa precipitación de las proteínas de lastre. Después de eso la mezcla de reacción se filtra a través de filtros de papel ("cinta blanca"). El volumen del filtrado es 300 ml. La solución obtenida se somete a irradiación gamma en una dosis de 1,0 Mrad. Después de la irradiación la solución se somete a filtración esterilizante, se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml y se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no exceda el 2%. Como resultado, se obtiene una composición, que posee la siguiente formulación en porcentaje en peso:

- | | | |
|----|----|---|
| 40 | 1. | Protosubtilina G3Kh1,9 |
| | 2. | Dextrano (peso molecular 40 kDa) 10,0 |
| | 3. | Óxido de polietileno PEO-15000,5 |
| | 4. | Tampón de fosfato de sodio 0,025 M 87,6 |

La actividad proteolítica de la composición es 750 PU/g.

Ejemplo 6

5 Se disuelven 15 de óxido de polietileno PEO-1500 en 300 ml de una solución al 5% de dextrano que posee un peso molecular de 40 kDa en un tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 8,2, se añaden 7,5 g de protosubtilina G3Kh, se agita la mezcla a una temperatura de 18-20°C durante 30 minutos. Después se precipitan las proteínas de lastre mediante técnicas de precipitación con sal. Para realizar ello, se añaden a la mezcla en sucesión hasta disolución completa 1,3 g de fosfato de sodio disustituido hasta la concentración final de 0,45% y 1,9 g de cloruro de calcio hasta la concentración final de 0,63%. Después de la disolución de cloruro de calcio se forma un precipitado insoluble de fosfato de calcio en la mezcla de reacción, y este fosfato de calcio adsorbe las proteínas de lastre. La mezcla se mantiene durante 12 horas a una temperatura de 4 a 8°C para la completa precipitación de las proteínas de lastre. Después de eso la mezcla de reacción se filtra a través de filtros de papel ("cinta blanca"). El volumen del filtrado es 300 ml. La solución obtenida se somete a irradiación gamma en una dosis de 1,2 Mrad. Después de la irradiación la solución se somete a filtración esterilizante, se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml y se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no exceda el 2%. Como resultado, se obtiene una composición que posee la siguiente formulación en porcentaje en peso:

- | | | |
|----|----|---|
| 15 | 1. | Protosubtilina G3Kh2,5 |
| | 2. | Dextrano (peso molecular 40 kDa)5,0 |
| | 3. | Óxido de polietileno PEO-15005,0 |
| | 4. | Tampón de fosfato de sodio 0,025 M 87,5 |

La actividad proteolítica de la composición es 500 PU/g.

20 Ejemplo 7

25 Se disuelven 15 de óxido de polietileno PEO-4000 en 300 ml de una solución al 5% de dextrano que posee un peso molecular de 70 kDa en un tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 8,2, se añaden 7,5 g de protosubtilina G10Kh, se agita la mezcla a una temperatura de 18-20°C durante 30 minutos. Después se precipitan las proteínas de lastre mediante técnicas de precipitación con sal. Para realizar ello, se añaden a la mezcla en sucesión hasta disolución completa 1,3 g de fosfato de sodio disustituido hasta una concentración final de 0,45% y 1,9 g de cloruro de calcio hasta una concentración final de 0,63%. Después de la disolución de cloruro de calcio se forma un precipitado insoluble de fosfato de calcio en la mezcla de reacción, y este fosfato de calcio adsorbe las proteínas de lastre. La mezcla se mantiene durante 12 horas a una temperatura de 4 a 8°C para la completa precipitación de las proteínas de lastre. Después de eso la mezcla de reacción se filtra a través de filtros de papel ("cinta blanca"). El volumen del filtrado es 300 ml. La solución obtenida se somete a irradiación gamma en una dosis de 0,8 Mrad. Después de la irradiación la solución se somete a filtración esterilizante, se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml y se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no exceda el 2%. Como resultado, se obtiene una composición que posee la siguiente formulación en porcentaje en peso:

- | | | |
|----|----|---|
| 35 | 1. | Protosubtilina G10Kh2,5 |
| | 2. | Dextrano (peso molecular 70 kDa)5,0 |
| | 3. | Óxido de polietileno PEO-40005,0 |
| | 4. | Tampón de fosfato de sodio 0,025 M 87,5 |

La actividad proteolítica de la composición es 1000 PU/g.

Ejemplo 8

40 Preparación de la composición reivindicada que consiste en un componente activo y un disolvente (formulación de dos componentes)

Componente (1):

45 Se disuelven 0,5 de óxido de polietileno PEO-1500 en 300 ml de una solución al 10% de dextrano que posee un peso molecular de 40 kDa en un tampón de fosfato de sodio 0,025 M con pH 8,2, se añaden 5,7 g de protosubtilina G3Kh, se agita la mezcla a una temperatura de 18-20°C durante 30 minutos. Después se precipitan las proteínas de lastre mediante técnicas de precipitación de sal. Para realizar ello, se añaden a la mezcla en sucesión hasta disolución completa 1,3 g de fosfato de sodio disustituido hasta una concentración final de 0,45% y 1,9 g de cloruro

de calcio hasta una concentración final de 0,63%. Después de la disolución de cloruro de calcio se forma un precipitado insoluble de fosfato de calcio en la mezcla de reacción, y este fosfato de calcio adsorbe las proteínas de lastre. La mezcla se mantiene durante 12 horas a una temperatura de 4 a 8°C para la completa precipitación de las proteínas de lastre. Después de eso la mezcla de reacción se filtra a través de filtros de papel ("cinta blanca"). El volumen del filtrado es 300 ml. La solución obtenida se somete a irradiación gamma en una dosis de 1,0 Mrad. Después de la irradiación la solución se somete a filtración esterilizante, se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml y se liofiliza hasta un contenido de humedad residual que no exceda el 2%. Como resultado, se obtiene el componente (1) de la composición, que posee la siguiente formulación en porcentaje en peso:

- | | | |
|----|----|---|
| 5 | 1. | Protosubtilina G3Kh1,9 |
| 10 | 2. | Dextrano (peso molecular 40 kDa) 10,0 |
| | 3. | Óxido de polietileno PEO-15000,5 |
| | 4. | Tampón de fosfato de sodio 0,025 M 87,6 |

La actividad proteolítica del Componente (1) es 750 PU/g.

Componente (2) (disolvente):

- 15 Se disuelven 15,0 g de óxido de polietileno PEO-1500 en 300 ml de un tampón de fosfato de sodio 0,025 M. Después la solución se filtra a través de filtros de papel ("cinta blanca"). El volumen del filtrado es 300 ml. La solución obtenida se somete a irradiación gamma en una dosis de 1,0 Mrad. Después de la irradiación la solución se somete a filtración esterilizante y se envasa en lotes de 10 ml en viales de 15 ml. Como resultado, se obtiene el componente (2) de la composición, que posee la siguiente formulación en porcentaje en peso:

- | | | |
|----|----|---|
| 20 | 1. | Óxido de polietileno PEO-15005,0 |
| | 2. | Tampón de fosfato de sodio 0,025 M 95,0 |

La disolución del componente (1) en el disolvente (componente (2)) y la liofilización dan la composición farmacéutica reivindicada.

Ejemplo 9

25 Investigación de las propiedades farmacológicas de la composición reivindicada ("Trombovazim")

Las propiedades farmacológicas de la composición reivindicada (siendo su denominación condicional "Trombovazim") se han controlado en condiciones de laboratorio in vitro e in vivo.

- 30 Las propiedades trombolíticas de la composición se han investigado en un modelo de trombólisis in vitro (Figura 1). Tal como puede observarse a partir de la Figura 1, "Trombovazim" produce un efecto trombolítico abruptamente pronunciado, que con seguridad excede en la concentración terapéutica estándar 50 PhU/ml el efecto de la fibrinolisisina ($p < 0,02$); tripsina ($p < 0,01$); y trombólisis espontánea en solución fisiológica ($p < 0,01$). Debe observarse que a medida que la "edad" del trombo aumenta hasta los 7 días, las propiedades trombolíticas de "Trombovazim" se conservan (Figura 2), mientras la fibrinolisisina prácticamente no actúa en el trombo de 7 días. Durante las primeras dos horas la acción de la fibrinolisisina no difiere con certeza de la lisis espontánea de fondo en solución fisiológica. A fines del cuarto día la composición reivindicada disuelve el trombo completamente, mientras la fibrinolisisina lisa solamente el 20% de la masa del trombo "viejo".

- 35 Se sabe que la fibrinolisisina es el fibrinolítico más activo (2), mientras preparaciones tales como estreptoquinasa, uroquinasa, alteplasa y activador de plasminógeno de tejidos son fibrinolíticos indirectos y su acción trombolítica está mediada por la activación del sistema de fibrinólisis y producción de fibrinolisisina endógena, llevando la última a la lisis del trombo formado (1).

- 40 La actividad trombolítica específica de "Trombovazim" in vivo se ha investigado en un modelo de trombosis de arteria carótida inducida en ratas mediante la aplicación de cloruro ferroso.

- 45 Los resultados del efecto de la administración profiláctica de "Trombovazim" (80 PU por animal) en el flujo sanguíneo (ml/min) a lo largo de las arterias carótidas ipsilaterales después de la aplicación de cloruro ferroso (0-15 min) en ratas de la línea Wistar se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

| Grupo | 0 min | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | 75 min | 90 min |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Control n = 9 | 3,8 ± 0,3 | 2,3 ± 0,4 | 0,9 ± 0,5 | 0,4 ± 0,2 | 0,5 ± 0,4 | 0,2 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 |
| Experimento n = 10 | 2,9 ± 0,3 | 2,5 ± 0,1 | 2,1 ± 0,3 | 1,9 ± 0,4 | 1,9 ± 0,5 | 1,9 ± 0,4 | 1,7 ± 0,4 |

5 Tal como se observa a partir de los resultados presentados, la administración profiláctica de "Trombovazim" efectivamente limita el proceso de trombosis en la arteria carótida durante las primeras 1,5 horas después del efecto de cloruro ferroso en la misma.

Los resultados del efecto de la administración terapéutica de "Trombovazim" (80 PU por animal) en el flujo sanguíneo (ml/min) a lo largo de las arterias carótidas ipsilaterales después de la aplicación de cloruro ferroso (0-15 min) en ratas de la línea Wistar se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

| Grupo | 0 min | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | 75 min | 90 min |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Control n = 8 | 3,3 ± 0,4 | 2,6 ± 0,6 | 2,8 ± 0,9 | 2,1 ± 0,7 | 2,3 ± 0,7 | 1,2 ± 0,4 | 0,9 ± 0,4 |
| Experimento n = 9 | 3,8 ± 0,3 | 3,3 ± 0,5 | 2,7 ± 0,5 | 1,7 ± 0,4 | 1,6 ± 0,3 | 1,6 ± 0,4 | 1,8 ± 0,4 |

10

15 Tal como se observa en los resultados presentados, la administración terapéutica de "Trombovazim" efectivamente inhibe el proceso de trombosis en la arteria carótida durante las primeras 1,5 horas después del efecto del cloruro ferroso en las mismas. Además, las investigaciones histológicas (morfométricas) han demostrado que en la administración terapéutica de "Trombovazim" después de 24 horas la proporción de animales con oclusión completa de la arteria carótida y con la presencia de un trombo en la misma se reduce 3 veces, siendo esto indicativo de una actividad trombolítica pronunciada en la preparación.

20 Las propiedades antiinflamatorias de la composición reivindicada se han investigado en un modelo para inducir uno de los principales mediadores de inflamación – factor de necrosis tumoral (α TNF) en ratones de la línea CBA con shock endotóxico (Figura 3). La actividad del α TNF se midió biológicamente, utilizando células lineales L929 y se expresó en unidades de acción (UA). En la Figura 3 se muestran: la actividad de α TNF en animales intactos (1) y en animales después de la administración de la endotoxina (2). La administración de "Trombovazim" una hora antes de la administración de la endotoxina (3) reduce 50 veces la actividad de α TNF, esto prueba las propiedades antiinflamatorias de "Trombovazim".

25 Las propiedades citoprotectoras de "Trombovazim" se han estudiado en un modelo de gastropatía por indometacina (Tabla 1) y miocarditis por adrenalina en ratas (Figura 4).

| N° de grupo | Control: 6,2 mg de indometacina administrada por vía intragástrica 1 hora antes del efecto experimental de la administración intraperitoneal de 3 ml de solución fisiológica | | | Experimento: 6,2 mg de indometacina administrada por vía intragástrica 1 hora antes del efecto experimental de la administración intraperitoneal de 3 ml de "Trombovazim" | | |
|-------------|--|------------------------------|-------------------|---|------------------------------|-------------------|
| | Estómago, mm ² SH | Sangrado, mm ² SB | % de lesiones, S% | Estómago, mm ² SH | Sangrado, mm ² SB | % de lesiones, S% |
| 1 | 910 | 17,3 | 1,9 | 830 | 29,2 | 3,5 |
| 2 | 685 | 26,9 | 3,9 | 778 | 13,6 | 1,8 |
| 3 | 650 | 24,0 | 3,7 | 845 | 12,2 | 1,4 |
| 4 | 784 | 18,4 | 2,3 | 745 | 8,54 | 1,1 |
| 5 | 726 | 34,3 | 4,7 | 823 | 7,6 | 1,1 |
| 6 | 927 | 22,7 | 2,5 | 769 | 0 | 0 |
| 7 | 699 | 46,6 | 6,7 | 778 | 0 | 0 |
| 8 | 853 | 17,0 | 2,0 | 575 | 10,2 | 1,8 |
| 9 | 892 | 34,1 | 3,8 | 653 | 16,2 | 2,4 |
| 10 | - | - | - | 568 | 0 | 0 |
| X ± SD | 792 ± 106 | 26,8 ± 9,9 | 3,5 ± 1,5 | 715 ± 151 | 9,8 ± 9,0 | 1,3 ± 1,2 |

A partir de la Tabla presentada se concluye que los grupos de control y experimental de las ratas son comparables en términos del área de estómago total (SH): no existió diferencia confiable entre las características. El área de sangrado (SB) en los grupos difirió con seguridad: en el grupo con administración preliminar de "Trombovazim" (experimento) SB es 3 veces más pequeño que en el control ($p < 0,01$). La misma relación confiable se observa cuando se compara el área relativa afectada (S%). Por ello, "Trombovazim" muestra un efecto citoprotector pronunciado en el caso de lesión con indometacina de la mucosa del estómago.

La Figura 4 muestra los datos de la investigación morfológica histológica del volumen de necrosis y cambios distrofos en el miocardio de ratas con miocarditis por adrenalina. Se determinó planimétricamente el volumen de lesiones y se expresó en porcentaje de la densidad de volumen que es igual a la relación volumen de lesiones/valor total de tejido multiplicada por 100%. En el grupo de control (K), después de administrar adrenalina, se administró 1,0 ml de solución isotónica de NaCl por vía intraperitoneal dos veces por día; en el grupo experimental (TRB) se administró 1 ml de "Trombovazim" por vía intraperitoneal dos veces por día. A partir de los resultados presentados se concluye que después del desarrollo de miocarditis por adrenalina el tratamiento con "Trombovazim" con seguridad reduce 1,5 veces el número de necrosis en el músculo cardíaco al final del 3° día: (TBR necr.) en comparación con el control (K necr.). Los cambios distróficos en el músculo cardíaco en el grupo experimental (TBR distr.) al final del 7° día son con seguridad 2,5 veces más pequeños que en el grupo de control (K distr.).

Los resultados presentados en la Tabla 1 y en la Figura 4 demuestran que "Trombovazim" posee actividad citoprotectora y cardioprotectora pronunciada. El efecto protector de "Trombovazim" se manifiesta con seguridad en la gastropatía específica causada por preparaciones antiinflamatorias no esteroideas, particularmente por indometacina, y el efecto terapéutico de "Trombovazim" se manifiesta con seguridad en la miocarditis aguda por adrenalina, en cuya patogénesis el papel principal es desempeñado por isquemia aguda, necrosis con el desarrollo de distrofia del miocardio.

Los efectos de desintoxicación, antiisquémicos y citoprotectores se investigaron también en el modelo de la isquemia hepática/reperfusión. Para este fin, en los grupos experimentales y de control de ratas de la línea Wistar (10 ratas en cada grupo) la tríada hepática en los animales después de la laparotomía se clameó durante 20 minutos, es decir, la circulación sanguínea y linfática regionales se bloquearon completamente. Después se restauró el flujo de sangre, y se investigó la estructura histológica del hígado en los animales (el principal criterio cuantitativo fue la acumulación de leucocitos en los ganglios linfáticos regionales como la característica de la respuesta a la lesión citotóxica del tejido hepático por los productos de isquemia/reperfusión: peróxidos y radicales libres). Los resultados de la investigación se presentan en la Figura 5.

Tal como se observa a partir de los resultados presentados, "Trombovazim" produce un efecto hepatoprotector en el modelo de isquemia/reperfusión hepática, y esta en una confirmación adicional de las propiedades citoprotectoras, de desintoxicación y antiinflamatorias de "Trombovazim".

REIVINDICACIONES

1. Una composición que posee propiedades trombolíticas, antiinflamatorias, de desintoxicación y de actividad citoprotectora para tratar enfermedades acompañadas de isquemia, trombosis, intoxicación y/o inflamación, que comprende proteasas activas inmovilizadas en una mezcla de óxido de polietileno soluble en agua y dextrano.
- 5 2. Una composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la inmovilización de las proteasas en la mezcla de polímeros solubles en agua se realiza con la ayuda de radiación ionizante, mediante la acción con las mismas en una solución acuosa que contiene proteasas activas y una mezcla de óxido de polietileno soluble en agua y dextrano
- 10 3. Una composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la radiación ionizante es un flujo de electrones acelerados, radiación gamma y radiación UV.
4. Una composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** las enzimas proteolíticas obtenidas a partir de material de partida microbiológico, animal o vegetal se utilizan como la proteasa activa.
5. Una composición según la reivindicación 4, **caracterizada porque** las enzimas proteolíticas producidas por *Bacillus subtilis* se utilizan como la proteasa activa.
- 15 6. Una composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende una forma medicinal de un componente que contiene proteasas activas liofilizadas inmovilizadas en una mezcla de óxido de polietileno y dextrano, y también combinaciones con aspirina, indometacina y diclofenac.
- 20 7. Una composición según la reivindicación 1, que comprende una forma de dosificación de dos componentes que contiene proteasas activas liofilizadas inmovilizadas en una mezcla de óxido de polietileno con dextrano y un disolvente.
8. Una composición según la reivindicación 7, en la que una solución de óxido de polietileno activado por radiación ionizante se utiliza como disolvente.
- 25 9. Una composición según la reivindicación 1, que es un agente terapéutico efectivo para tratar: enfermedad isquémica del corazón e infartos agudos del miocardio, alteraciones isquémicas de la circulación cerebral, trombosis arteriales y venosas, enfermedades obstructivas de los pulmones, gastritis y úlcera de estómago, enfermedades ginecológicas, estomatológicas y quirúrgicas.
10. Una composición según la reivindicación 9, en la que el efecto terapéutico se logra con la administración parenteral, oral, intracavitaria y local.
- 30 11. Una composición según la reivindicación 1, que produce un efecto protector en la mucosa del estómago en la administración combinada con analgésicos no esteroides.
12. Un método para preparar una composición de la reivindicación 1, que comprende la unión simultánea de proteasas a la mezcla de polímeros solubles en agua para la formación de una mezcla no sólida, y esterilización por radiación de la mezcla.
- 35 13. Un método según la reivindicación 12, en el que la radiación es un flujo de electrones acelerados, radiación gamma o radiación UV.
14. Un método según la reivindicación 12, en el que dicha proteasa es subtilisina.

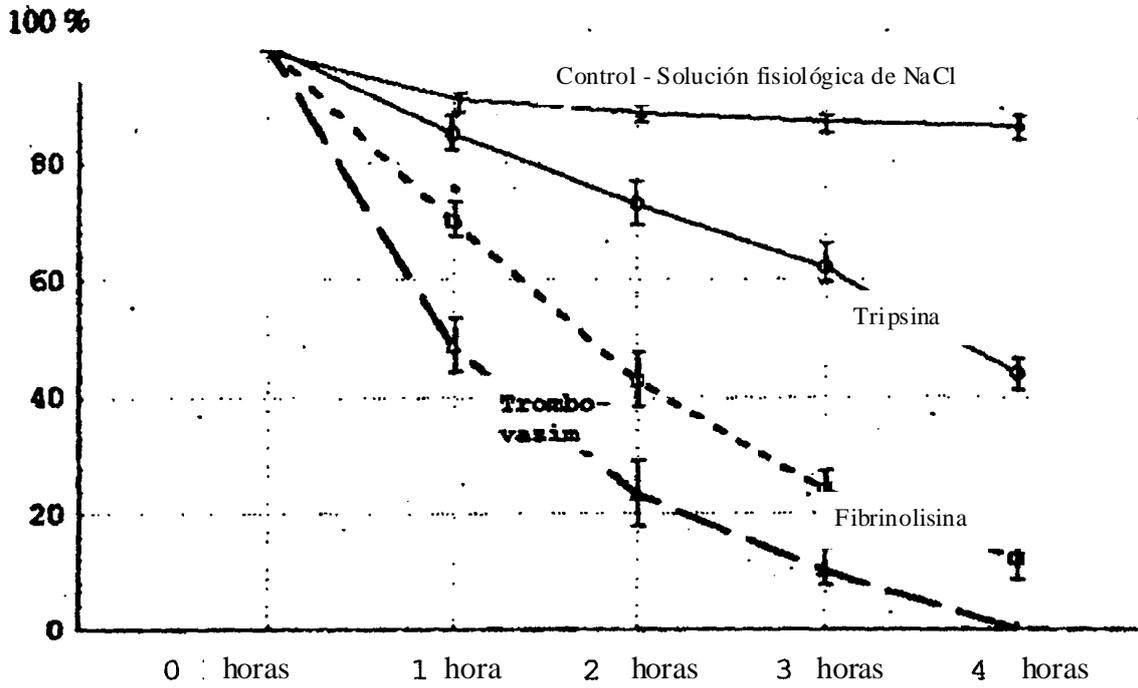


Fig. 1

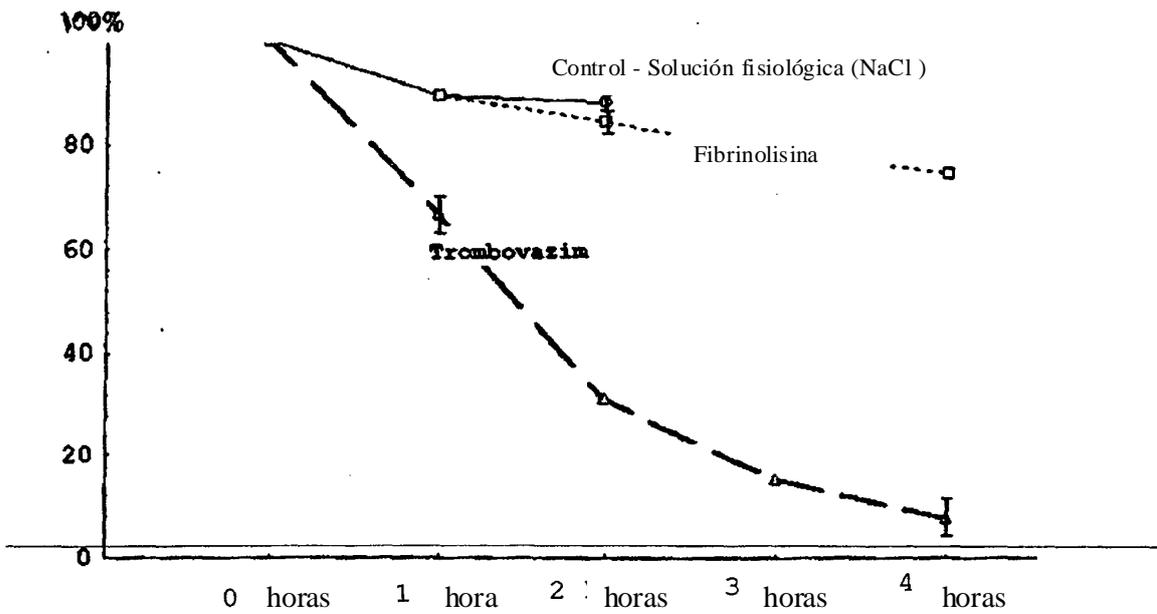


Fig. 2

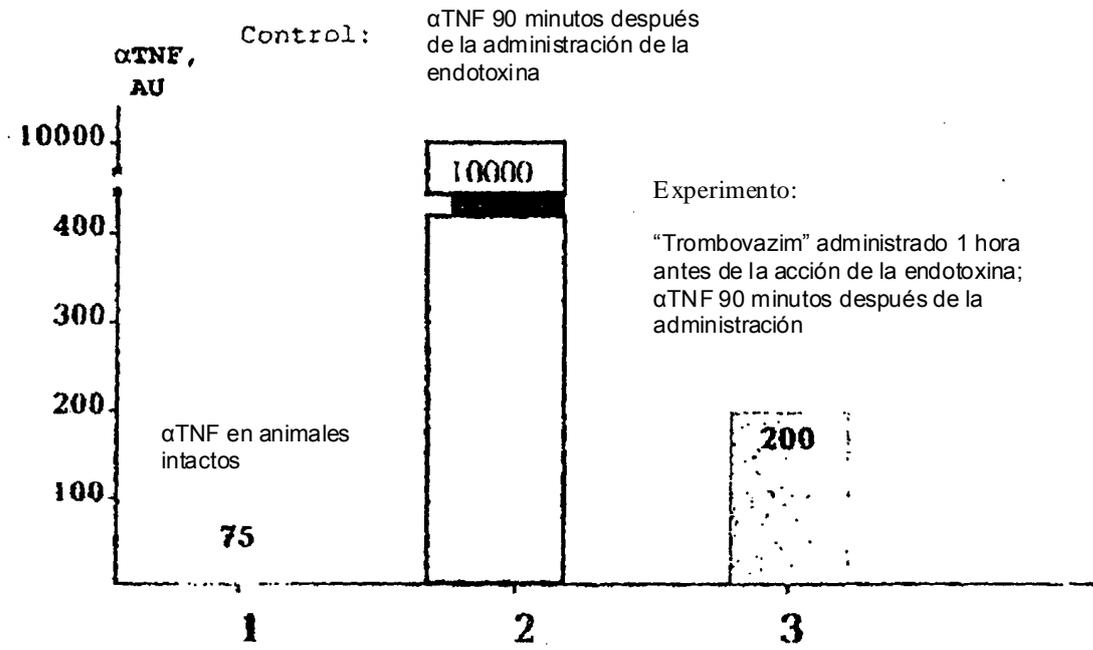


Fig. 3

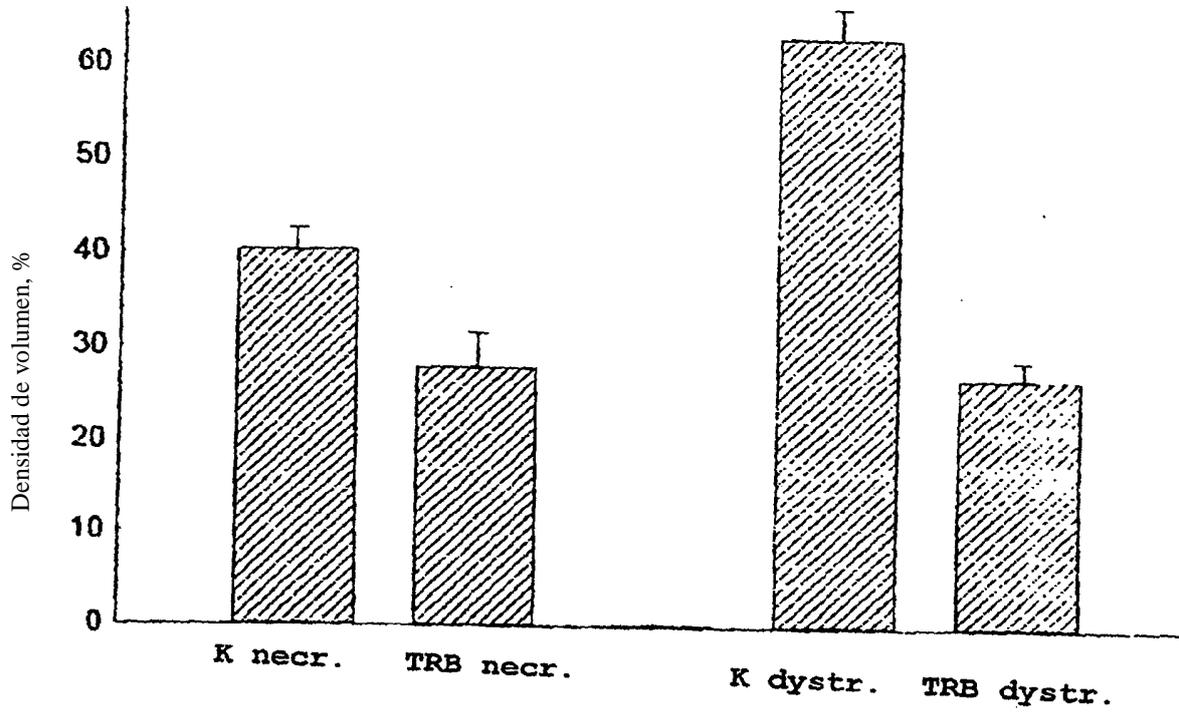


Fig. 4