

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 538**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2004 E 04796860 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1682168**

54 Título: **Proteasas no pancreáticas para controlar la concentración de colecistocinina (CCK) en plasma y para tratar el dolor**

30 Prioridad:

29.10.2003 US 515552 P

05.12.2003 US 527490 P

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

03.09.2013

73 Titular/es:

ELI LILLY AND CO. (100.0%)

**Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285 , US**

72 Inventor/es:

MARGOLIN, ALEXEY L.;

SHENOY, BHAMI C. y

MCGRATH, MARGARET

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 421 538 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

Proteasas no pancreáticas para controlar la concentración de colecistocinina (CCK) en plasma y para tratar el dolor

5 **Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere a métodos para mantener la concentración de colecistocinina (CCK) en plasma en un mamífero. Además, la invención proporciona métodos para su uso en el tratamiento del dolor abdominal en un mamífero. Los métodos para uso en esta invención implican administrar al mamífero proteasas no pancreáticas, que consisten en seaprosa, pronasa y serrapeptasa (en el presente documento posteriormente denominadas simplemente una "proteasa no pancreática") o composiciones que las comprenden. Estos métodos son particularmente útiles para tratar el dolor abdominal en un mamífero que padece pancreatitis aguda o crónica.

15 **Antecedentes de la invención**

La digestión es el proceso fisiológico mediante por el que los alimentos ingeridos se rompen en componentes nutritivos fácilmente absorbidos, incluyendo vitaminas y oligoelementos. Después de la ingestión, los alimentos pasan a través de varios segmentos del aparato digestivo y la digestión se lleva a cabo, principalmente por las enzimas digestivas. Los tres grupos de enzimas digestivas esenciales para este proceso incluyen proteasas (para la digestión de proteínas), lipasas (para la digestión de grasas) y amilasas (para la digestión de hidratos de carbono).

La digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes se producen en el intestino delgado. Allí, los alimentos ingeridos se rompen por las enzimas digestivas para la absorción fácil. La mayoría de las enzimas digestivas se secretan por el páncreas y llegan al intestino delgado a través a través del conducto pancreático.

La observación a principios de la década de 1970 de que los inhibidores de tripsina colocados en el intestino delgado superior de la rata estimulaban la secreción de enzimas pancreáticas, produjo el entendimiento de que la tripsina y la quimotripsina son críticas para controlar la secreción de enzimas digestivas por el páncreas (G.M. Green y R.L. Lyman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140, 6-12 (1972)). De forma similar, también se observó que la eliminación o diversión de bilis y jugos pancreáticos del intestino delgado superior estimulaba la secreción de enzimas pancreáticas. Estos datos sugerían el siguiente mecanismo de retroalimentación negativa: la estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas está controlada por el nivel de actividad de tripsina en la luz del intestino delgado.

En casos de insuficiencia pancreática, el páncreas fracasa en producir y/o secretar cantidades suficientes de enzimas digestivas para apoyar los procesos digestivos normales. Esta insuficiencia típicamente produce digestión defectuosa, que a su vez produce absorción defectuosa. La insuficiencia pancreática se manifiesta en enfermedades, tales como pancreatitis (formas tanto aguda como crónica) y fibrosis quística, y en algunas cirugías gastrointestinales (GI) posoperatorias.

La pancreatitis crónica y aguda son enfermedades caracterizadas por fibrosis y pérdida irreversible de la función exocrina pancreática. Las enfermedades también se caracterizan por la liberación y activación de enzimas digestivas en el páncreas, lo que produce la autodigestión del órgano mismo. Mientras que algunos pacientes son tratados mediante la eliminación quirúrgica de las glándulas paratiroides, la pancreatitis crónica es en gran parte una enfermedad intratable mundial (S. Sidhu y R.K. Tandon, *Postgrad. Med. J.* **72**, 327-333 (1996)). El índice de incidencia para esta enfermedad en los Estados Unidos solo es de más de 100.000 personas cada año (Digestive Disease Statistics, NIDDK, 2003).

Hasta la fecha, la terapia para la insuficiencia pancreática se basa principalmente en preparaciones de extracto de enzimas pancreáticas porcinas administradas por vía oral que contiene componentes lipasa, proteasa y amilasa. Tales preparaciones enzimáticas típicamente incluyen altos niveles de lipasa para el tratamiento de esteatorrea (excreción de grasa, debido a la digestión deficiente/absorción deficiente de grasa); mientras que generalmente se piensa que los altos niveles de proteasas son más eficaces en el tratamiento de azotorrea (excreción de proteínas, debido a la digestión deficiente/absorción deficiente de proteínas). Por varias razones, tales extractos pancreáticos han tenido un éxito limitado para el tratamiento del dolor abdominal. Las proteasas constituyen solo una proporción relativamente pequeña de tales extractos y en esa fracción, una cantidad aún menor de tripsina.

El mecanismo responsable para el dolor en pacientes de insuficiencia pancreática se entiende poco (J. Mössner, *Acute and Chronic Pancreatis* **79**, 861 (1999); N.J. Greenberger, *Pancreas Update* **28**, 689 (1999)).

Un mecanismo propuesto subyacente al dolor, incluyendo el dolor abdominal, está unido a la inducción de colecistocinina (de aquí en adelante "CCK"), un péptido que liberan las células epiteliales de la mucosa del duodeno y el sistema nervioso entérico y regula la digestión de nutrientes. Se ha mostrado que un aumento en CCK estimula la liberación de enzimas destructivas del páncreas. La liberación de CCK de las células epiteliales está modulada por la secreción de otros dos péptidos, un péptido monitor y un factor de liberación de CCK (CCK-RF) intestinal, que interaccionan con receptores específicos de superficie de células endocrinas (R.A. Liddle, *American Physiological*

Society, G319-G327 (1995)). La tripsina intraluminal, que puede degradar ambos de estos péptidos, inhibe la liberación de CCK y consecuentemente inhibe la secreción de enzimas pancreáticas. El efecto opuesto se alcanza si están presentes inhibidores de tripsina y alimentos para servir como sustratos de unión a tripsina. Como resultado, un aumento sostenido en CCK produce una estimulación continua de la producción de enzimas pancreáticas, que a su vez puede producir dolor. Basado en este mecanismo, un tratamiento propuesto para la pancreatitis crónica y su dolor asociado busca controlar los niveles de CCK usando una emulsión que contiene polipéptidos de longitud mezcla y un triglicérido de cadena media (solicitud de patente PCT WO 98/36734).

Aunque se ha descrito reducción del dolor con terapia de sustitución con enzimas pancreáticas porcinas, el papel de las proteasas generalmente para tratar el dolor permanece poco claro. Por ejemplo, un estudio demuestra que la perfusión intraduodenal con proteasas pancreáticas, tripsina y quimotripsina, pero no con amilasas o lipasas, suprime la secreción exocrina pancreática en pacientes que padecen pancreatitis crónica (J. Slaff et al., *Gastroenterology* **87**, 44-52 (1984)). Otros estudios describen que tales proteasas pancreáticas no son el factor principal en la reducción del dolor sino que en su lugar actúan sinérgicamente con los componentes lipasas y amilasa para ese fin (G. Isaksson e I. Ihse. *Dig. Dis. Sci.* **28**, 97-102. (1983); J. Slaff et al. *Gastroenterology* **87**, 44-52 (1983)). En contraste, otros estudios no describen mejoría en el dolor después de tratamientos con proteasas o extractos pancreáticos (H. Halgreen et al. *Scand. J. Gastroenterol.* **21**, 104-108 (1986); J. Mössner et al., *Digestion* **53**, 54-66 (1992)). En algunos casos, los pacientes tratados con grandes cantidades de enzimas han sido propensos a desarrollar cólicos (P.G. Lankisch, *Digestion* **37**, 4755 (1987)).

A pesar de los esfuerzos para delinear el papel de las proteasas pancreáticas para el tratamiento del dolor, incluyendo el dolor abdominal en pancreatitis, todavía existe la necesidad para pautas de tratamiento adicionales. La presente invención aborda esa necesidad.

Compendio de la invención

La presente invención se dirige a métodos para mantener un nivel basal de la concentración de colecistocinina (CCK) en plasma o reducir la concentración de CCK en plasma en un mamífero. La invención proporciona además métodos para su uso en el tratamiento del dolor, específicamente el dolor abdominal, en un mamífero administrando a dicho mamífero una proteasa no pancreática o composición de la misma. Según esta invención, la forma cristalina, semicristalina o amorfa de una proteasa no pancreática, o composiciones de la misma, se puede usar ventajosamente en métodos para el tratamiento de un mamífero que padece dolor en pancreatitis crónica o aguda o afecciones relacionadas. En una forma de realización preferida de esta invención, la proteasa no pancreática está en forma de cristales de proteasa.

Los expertos en la materia apreciarán otros objetos de la invención, en vista de la divulgación en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra cristales de seaprosa hechos crecer en presencia de carbonato de sodio 10 mM (pH 9,5), en imágenes de microscopía óptica. Véase el ejemplo 1.

La figura 2 ilustra los niveles de CCK en plasma sanguíneo de ratas medidos mediante radioinmunoensayo ("RIA") de CCK en respuesta a dietas que contienen varios suplementos de enzimas exógenas. Véase el ejemplo 3.

La figura 3 ilustra los niveles de CCK en plasma sanguíneo de ratas medidos mediante radioinmunoensayo ("RIA") de CCK en respuesta a dietas que contienen suplementos de cristales de seaprosa exógenos. Véase el ejemplo 4.

La figura 4 ilustra los niveles de CCK en plasma sanguíneo de ratas medidos mediante radioinmunoensayo ("RIA") de CCK en respuesta a dietas que contienen varios suplementos de enzimas exógenas. Véase el ejemplo 5.

La figura 3 ilustra los niveles de CCK en plasma sanguíneo de ratas medidos mediante radioinmunoensayo ("RIA") de CCK en respuesta a dietas que contienen suplementos de cristales de seaprosa exógenos. Véase el ejemplo 6.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que las proteasas no pancreáticas se pueden usar para mantener un nivel basal de la concentración de CCK o reducir la concentración de CCK en plasma de mamíferos. Las proteasas no pancreáticas en todas las formas, incluyendo formas cristalina, semicristalina, líquida y amorfa, son particularmente útiles para controlar las concentraciones de CCK en plasma, produciendo a su vez una reducción en el dolor. Las proteasas específicas, es decir seaprosa, serrapeptasa (o serratiopeptidasa), pronasa o una mezcla de las mismas, son particularmente ventajosas para este fin.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tienen los significados que entienden comúnmente los expertos en la materia. Además, a menos que lo requiera el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

5 Se debe entender que los siguientes términos, a menos que se indique de otra manera, tienen los siguientes significados:

10 El término “colecistocinina” (“CCK”) se refiere a un péptido integrador, regulador que se libera de las células secretoras y fibras nerviosas en el intestino superior de mamíferos. Este péptido u hormona se secreta en la sangre tras la ingestión de proteínas y grasas. Las acciones fisiológicas de CCK incluyen, pero no están limitadas a, la estimulación de la secreción pancreática y contracción de la vesícula biliar, regulación del vaciado gástrico e inducción de saciedad. Por tanto, CCK sirve para regular, de una manera altamente coordinada, la digestión de los nutrientes. El cerebro produce y procesa principalmente el octapéptido lineal COOH terminal de CCK (CCK-8), mientras que el intestino produce formas mayores del péptido, tales como CCK-58, -33 y -22. Mientras que CCK en tejido y sangre varía de 4-83 aminoácidos de tamaño, las formas más pequeñas (tales como CCK-8) muestran la actividad biológica de las formas mayores tanto en el cerebro (como un neurotransmisor) como en el sistema periférico (como una hormona). CCK se encuentra predominantemente como un neuropéptido que desempeña papeles moduladores en una variedad en una variedad de estados y trastornos conductuales.

20 El término “péptido de alimentación” se refiere generalmente a una clase de péptidos integradores que influyen la regulación de la alimentación y la ingesta alimenticia a través del sistema periférico, así como del sistema nervioso central (“SNC”). Como se usa en el presente documento, los péptidos de alimentación se pueden distinguir de la clase más general de péptidos reguladores que tienen funciones integradoras más limitadas o menos documentadas en la periferia. CCK también se ha denominado en la técnica como un péptido de alimentación.

25 El término “alimento” abarca cualquier sustancia que puede ser ingerida por un mamífero o administrada a un mamífero por medios no orales, para dar energía. Como se usa en el presente documento, alimento abarca cualquier sustento en cualquier forma, incluyendo, por ejemplo, forma sólida o líquida, e incluyendo, por ejemplo, suplementos nutricionales.

30 El término “péptido monitor”, también denominado inhibidor de tripsina secretada pancreática (“PSTI”), estimula el crecimiento de las células epiteliales intestinales e induce la secreción de enzimas pancreáticas en el intestino delgado de mamíferos. El péptido monitor se activa comúnmente en respuesta a la ingesta de proteínas e induce la secreción y liberación de CCK del intestino. También se denomina comúnmente en la técnica como “péptido liberador de CCK sensible a tripsina” (S. Tsuzuki et al., *Eur. J. Biochem.* **199**, 245-252 (1991); R. Yamanishi et al., *Biochem. J.* **291**, 57-63 (1993)).

35 El término “factor de liberación de CCK intestinal” se refiere a un factor de origen intestinal que se ha caracterizado parcialmente y se piensa que desempeña un papel en la estimulación de la secreción de CCK después de la ingestión de proteínas o grasas. A través de mecanismos en gran parte desconocidos, se piensa que este y otros factores de liberación de CCK (es decir, péptidos monitores) proporcionan mecanismos de retroalimentación positivos y negativos para la regulación de la secreción de CCK.

40 El término “mamífero” se refiere a un ser humano o animal. Por ejemplo, un animal puede ser un primate no humano, roedor, canino, cerdo, gato, vaca, caballo y cabra. En una forma de realización preferida de esta invención, el mamífero es humano.

45 El término “digestión defectuosa” se refiere a la rotura alterada de nutrientes (tales como hidratos de carbono, proteínas, grasas) en sus constituyentes absorbibles (mono-, di u oligosacáridos, aminoácidos, oligopéptidos, ácidos grasos y monoglicéridos).

50 El término “malabsorción” se refiere a la absorción alterada de nutrientes digeridos, incluyendo vitaminas y oligoelementos, del intestino delgado o el intestino grueso. Puede ser debido a la captación mucosal defectuosa por el recubrimiento intestinal o anomalías particulares de digestión. La malabsorción intestinal se puede producir para muchos nutrientes o para macronutrientes específicos, es decir, hidratos de carbono, grasas o proteínas, así como para micronutrientes, tales como calcio, magnesio, hierro y vitaminas. La malabsorción puede provenir de varias afecciones, algunas de las cuales incluyen, por ejemplo, intolerancia a lactosa, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn e insuficiencia pancreática, crecimiento bacteriano excesivo, síndrome del intestino corto, amiloidosis, divertículos intestinales cortos, escleroderma, esprúe tropical, infección por *helicobacter pylori*, terapia de radiación, quimioterapia, obstrucción de conductos torácicos, tal como linfagiectasia, enteritis eosinofílica, linfoma, mastocitosis, enteropatía con pérdida de proteínas y enfermedad de Menetrier.

55 El término “pancreatitis crónica” se refiere a un proceso recurrente en el que la autodigestión de tejido pancreático se produce por sus propias enzimas. En esta enfermedad, las enzimas pancreáticas que normalmente facilitan la digestión de nutrientes se activan dentro y escapan o se liberan del conducto pancreático o las células acinares al

páncreas donde inducen la necrosis del tejido. Crónicamente, tal acción puede producir pérdida morfológica y funcional a largo plazo del órgano. Los dos tipos más frecuentes de pancreatitis crónica en adultos son la pancreatitis inducida por alcohol y la idiopática. En menores, la pancreatitis crónica con frecuencia está causada por fibrosis quística.

5 “Pancreatitis aguda” es un proceso inflamatorio agudo del páncreas que puede implicar tejidos peripancreáticos o sistemas de órganos remotos, o ambos. Se puede producir como un ataque aislado o reaparecer en distintos episodios con reversión a histología normal entre ataques. Por definición, la pancreatitis aguda es reversible; se distingue de la pancreatitis crónica por la ausencia de inflamación continua, cambios estructurales irreversibles y alteración permanente de la función pancreática exocrina y endocrina. La pancreatitis aguda se clasifica además en formas moderadas y graves. La pancreatitis aguda moderada se asocia con disfunción orgánica mínima y recuperación sin complicaciones. La pancreatitis aguda grave se asocia con necrosis pancreática y puede producir insuficiencia orgánica y/o complicaciones locales. Las complicaciones locales de la pancreatitis aguda incluyen acumulación de líquidos, formación de pseudoquistes, abscesos, necrosis pancreática, hemorragia, trombosis venosa y formación de pseudoaneurisma.

El término “dolor” se refiere a una experiencia sensorial asociada con daño tisular real o potencial. La sensación física de dolor puede surgir de una causa aislada y constituir un síntoma asociado a una enfermedad, o el dolor mismo puede ser un síndrome que constituye el problema principal, por ejemplo, dolor neuropático. En una forma de realización de esta invención, el dolor no está producido o acompañado por ninguna respuesta o enfermedad inflamatoria o autoinmune. En otra forma de realización de esta invención, el término dolor “abdominal” no incluye dolor pélvico femenino debido a funciones o enfermedades ginecológicas. En otra forma de realización de esta invención, el término dolor “abdominal” no incluye síndrome de dolor pélvico femenino, incluyendo parametritis.

El término “proteasa” se refiere a una proteínasa, enzima proteolítica o peptidasa, que es cualquier enzima que cataliza la escisión de los enlaces peptídicos amida interiores en una proteína. Específicamente, las proteasas catalizan la conversión de proteínas en sus aminoácidos componentes rompiendo el enlace amida entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro. Las proteasas generalmente se identifican por su tipo catalítico, por ejemplo, ácido aspártico peptidasas, cisteína (tiol) peptidasas, metalopeptidasas, serina peptidasas, treonina peptidasas, proteasa alcalina o semialcalina, neutras y peptidasas de mecanismo catalítico desconocido (véase <http://merops.sanger.ac.uk>). Según una forma de realización preferida, las proteasas útiles en los métodos de esta invención son proteasas no pancreáticas. El término “proteasas no pancreáticas” se refiere a proteasas que son: (1) no purificadas a partir de tejido o extractos de páncreas humano o animal y (2) no incluyen tripsina y opcionalmente (3) no incluyen quimotripsina, estén o no la tripsina y la quimotripsina purificadas de extractos o tejido de páncreas humano o animal o producidas en un huésped microbiano o unicelular. Según una forma preferida de esta invención, las proteasas no pancreáticas se producen en un huésped microbiano o unicelular. Tales huéspedes unicelulares se pueden seleccionar de cualquiera de células de bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos o mamíferos en cultivo. Según una forma de realización preferida de esta invención, la proteasa no pancreática se produce en *Aspergillus melleus*. De forma alternativa, las proteasas no pancreáticas para su uso en esta invención se pueden sintetizar por técnicas de síntesis de péptidos convencionales.

“Seaprosa” (“SAP”) se refiere a una enzima proteolítica semialcalina cristalina homogénea producida por *Aspergillus melleus* y está comercialmente disponible de Amano Enzyme Inc., Japón. Se puede preparar SAP mediante un proceso de fermentación bien líquido o bien sólido. También se ha denominado la seaprosa como seaprosa-S, proteinasa alcalina de *Aspergillus*; aspergilopeptidasa B; API 21; aspergilopepsina B; aspergilopepsina F; proteinasa alcalina de *Aspergillus candidus*; proteinasa alcalina de *Aspergillus flavus*; proteinasa semialcalina de *Aspergillus melleus*; proteinasa alcalina de *Aspergillus oryzae*; proteinasa alcalina de *Aspergillus parasiticus*; serina proteinasa de *Aspergillus*; proteinasa alcalina de *Aspergillus sydowi*; proteinasa alcalina de *Aspergillus soya*; proteinasa alcalina de *Aspergillus melleus*; proteinasa alcalina de *Aspergillus sulphureus*; prozima; P 5380; ciorinasa; proteasa alcalina (*Penicillium citrinum*); sumizima MP; prozima 10; onoprosa; onoprosa SA; proteasa P; promelasa, proteinasa alcalina (*Penicillium citrinum*); proteinasa alcalina (*Aspergillus* sp.); alergeno Asp fl 1 (*Aspergillus flavus*); alergeno Asp fl 13 (*Aspergillus flavus*); alergeno Asp f 13 (*Aspergillus fumigatus*); alergeno Pen c2 (*Penicillium citrinum*); aspergilopeptidasa B; PepD; prtA y SUB2 (*Microsporium canis*). La seaprosa tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kD y es estable en un intervalo de pH 5,0-9,0. Además, seaprosa es una proteasa implicada en la rotura enzimática y más específicamente, corta preferentemente el sustrato que contiene un residuo de Phe en la posición P₁ de la cadena de proteína. Según una forma de realización de esta invención, se pueden usar uno o más tipos de seaprosa. De forma alternativa, se puede usar seaprosa en combinación con una o más proteasas no pancreáticas diferentes de seaprosa.

El término “lipasa” se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis, es decir, la separación del grupo hidroxilo y el átomo de hidrógeno de compuestos en fragmentos mediante la adición de agua, de lípidos a glicerol y ácidos grasos sencillos. Esta reacción enzimática habitualmente requiere iones de calcio (Ca²⁺). Las lipasas secretadas por el páncreas son muy importantes para la digestión de grasa (triglicéridos) en el bucle superior del intestino delgado. Las lipasas, por ejemplo, pueden derivar de fuentes animales o prepararse de fuentes microbianas o unicelulares.

65

- El término “amilasa” se refiere a una enzima que se produce en el páncreas y también en las glándulas salivales en seres humanos pero no en todos los mamíferos. La amilasa salival humana se conoce como ptialina. La amilasa es la principal enzima digestiva responsable para la digestión de hidratos de carbono, por ejemplo, polisacáridos, catalizando la conversión de los dos componentes del almidón (amilosa y amilopectina) en azúcares sencillos en el intestino delgado. Más específicamente, la amilasa hidroliza almidón, glucógeno y dextrinas para formar glucosa, maltosa y las dextrinas límite. Clínicamente, los niveles de amilasa en sangre con frecuencia están elevados en afecciones de pancreatitis aguda y a veces crónica. Las amilasas, por ejemplo, pueden derivar de fuentes animales o prepararse de fuentes microbianas o unicelulares.
- Mientras que los términos “proteasa”, “amilasa” y “lipasa” son más o menos universalmente conocidos en la técnica como las tres clases principales de enzimas digestivas, hay muchos tipos de enzimas que encajan con cada una de estas clases y realizan funciones claramente especializadas. Por ejemplo, las enzimas proteolíticas que ayudan en la función pancreática incluyen endopeptidasas (tripsina, quimotripsina, elastasa y calicreína) y exopeptidasas (carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B (E. Leberthal et al., *Pancreas* 9, 1-12(1994))). Otros ejemplos de proteasas incluyen bacilolisina, bromelina, ficina, orizina, papaína, pepsina, pronasa, Proteinasa K, Proteinasa S, seaprosa, serrapeptidasa, subtilisina, termolisina, trombina y otras enzimas similares. Se ejemplifica un resumen de proteasas no pancreáticas a continuación en la tabla 1. Las proteasas no pancreáticas para su uso en la invención son seaprosa, serrapeptasa y pronasa, divulgadas en la tabla 1A.

20 Tabla 1

Proteasa	Especie
metaloproteasa	<i>Serratia marcescens</i>
proteasa de Serratia (E.C.3.4.24.40) (Serralisina)	<i>Serratia sp. (cepa E-15)</i>
metaloproteasa p1	<i>Yersinia ruckeri</i>
metaloproteinasa (EC 3.4.24.-)	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
proteasa A	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
metaloproteasa	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum.</i>
proteasa tolerante a solventes orgánicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
metaloproteinasa alcalina	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>
metaloproteasa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
serralisina	<i>Pseudomonas sp. 'TAC II 18'</i>
proteasa alcalina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
APrA	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
metaloproteinasa alcalina	<i>Photobacterium luminescens</i>
metaloproteasa	<i>Proteus mirabilis</i>
metaloproteasa	<i>Yersinia pseudotuberculosis IP 32953</i>
metaloproteasa	<i>Yersinia pestis CO92</i>
metaloproteinasa alcalina	<i>Caulobacter crescentus CB15</i>
RB140	<i>Ruegeria sp. PR1b</i>
proteína similar a proteasa	<i>Azospirillum brasilense</i>
bl16027	<i>Bradyrhizobium japonicum USDA 110</i>
proteasa	<i>Sinorhizobium meliloti 1021</i>
rizobiocina RzcA	<i>Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii</i>
proteasa	<i>Azotobacter vinelandii</i>
proteasa	<i>Pseudomonas putida KT2440</i>
matrilisina	<i>Mus musculus</i>
proteasa	<i>Nostoc sp. PCC 7120</i>
proteasa alcalina	<i>Aspergillus fumigatus</i>
proteasa alcalina	<i>Aspergillus sp. MK245</i>
proteasa alcalina	<i>Aspergillus sp. MK285</i>
orizina (EC 3.4.21.63)	<i>Aspergillus oryzae</i>
proteasa alcalina	<i>Aspergillus viridinutans</i>
alergeno Asp fl 1	<i>Aspergillus flavus</i>
proteasa	<i>Aspergillus niger</i>
proteínasa alcalina	<i>Trichoderma hamatum</i>
serina proteasa extracelular; Tvsp1	<i>Hypocrea virens</i>
proteínasa alcalina (EC 3.4.21.-)	<i>Acremonium chrysogenum</i>
proteasa	<i>Gibberella zeae PH-1</i>
subtilasa	<i>Ophiostoma piceae</i>
proteasa similar a subtilisina	<i>Verticillium dahliae</i>
proteínasa similar a subtilisina Mp1	<i>Magnaporthe poae</i>
proteasa	<i>Magnaporthe grisea 70-15</i>
serina proteasa similar a subtilisina PR1A	<i>Metarhizium anisopliae var. anisopliae</i>
serina proteasa	<i>Tolyocladium inflatum</i>
proteasa similar a subtilisina PR1D	<i>Metarhizium anisopliae var. acridum</i>

Proteasa	Especie
proteasa similar a subtilisina SUB2	<i>Arthroderma benhamiae</i>
serina proteasa	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
proteasa	<i>Neurospora crassa</i>
proteasa similar a subtilisina	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
proteasa similar a subtilisina 2	<i>Microsporium canis</i>
proteasa similar a subtilisina SUB2	<i>Trichophyton rubrum</i>
proteasa	<i>Leptosphaeria maculans</i>
serina proteasa alcalina ver112	<i>Lecanicillium psalliotae</i>
serina proteasa alcalina	<i>Verticillium chlamydosporium var. chlamydosporium</i>
proteasa que degrada cutícula	<i>Cordyceps brongniartii</i>
proteasa	<i>Neurospora crassa</i>
serina proteasa alcalina	<i>Penicillium chrysogenum</i>
serina proteinasa	<i>Agaricus bisporus</i>
proteinasa de tipo subtilasa isp6	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
proteasa que degrada cutícula basiasina I	<i>Beauveria bassiana</i>
subtilasa	<i>Ophiostoma piliferum</i>
serina proteasa vacuolar	<i>Penicillium oxalicum</i>
Pen c 1; serina proteasa alcalina	<i>Penicillium citrinum</i>
proteasa similar a subtilisina SUB3	<i>Trichophyton rubrum</i>

Las proteasas, así como cualquier otra enzima para su uso en los métodos de esta invención, pueden derivar de origen microbiano, bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los producidos por tecnología de ADN recombinante. De forma alternativa, se pueden producir por técnicas de síntesis de péptidos convencionales. Según una primera forma de realización, las proteasas para su uso en los métodos de esta invención son proteasas no pancreáticas, es decir, seaprosa, serrapeptasa, pronasa o una mezcla de las mismas. Los ejemplos de pronasas incluyen: proteinasa A, proteinasa B, metaloendopeptidasa y metaloproteinasa. Las características de las proteasas no pancreáticas preferidas y sus usos hasta la fecha se enumeran a continuación en la tabla 1a.

Tabla 1a

	Seaprosa (SAP)	Serrapeptasa	Pronasa
Secuencia de proteína	282 aminoácidos	470 aminoácidos	La pronasa es una mezcla de endo- y exo-proteinasas. Corta casi cualquier enlace peptídico. Proteinasa A - 297 aminoácidos Proteinasa B - 299 aminoácidos Metaloproteinasa neutra - Micolisina - Metaloendopeptidasa - 334 aminoácidos
Peso molecular	28,5 kD	50,5 kD	Proteinasa A - 29,7 kD
pl	5,84	4,61	Proteinasa A - 9,04
Estabilidad	pH 5 a 9,0	Metaloproteína con Zn inactivada por pH ácido	La pronasa requiere iones de calcio. Retiene actividad en SDS al 1% y Triton X al 1%. Algunos componentes de la mezcla son muy estables a urea y guanidinio HCl, pero no se produce la digestión completa.
Estructura cristalina	disponible	disponible	Proteinasa A, proteinasa B y metaloendopeptidasa están disponibles
Huésped	<i>Aspergillus melleus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
Especificidad de sustrato	No específico	No específico	No específico
pH óptimo	pH 8	pH 9-10	pH 7,5; 7-8. Diferentes componentes de la mezcla pueden tener diferentes óptimos
Indicaciones	Acción antiinflamatoria Expectorante	- agente antiinflamatorio - enfermedad cardíaca - infección antibacteriana - acelera la cicatrización - dilatación del pecho - cistitis, epididimitis, periocoronitis - Expectoración - inadecuada de esputo en	Alivio de hinchazón, dificultad en expectoración

	Seaprosa (SAP)	Serrapeptasa	Pronasa
		bronquitis	
Fabricantes/ distribuidores	Amano Enzyme Inc., Japón (SAP usada en el presente documento se preparó por proceso de fermentación sólida)	GHARPURE LABORATORIES PVT. LTD. Takeda Chemical Industries, Ltd.	EMD Chemicals Inc. Kaken Pharmaceutical Co., Japón

La forma farmacéutica de una proteasa no pancreática o composición que comprende una proteasa no pancreática para su uso en los métodos de esta invención puede ser la de un líquido, sólido, suspensión o dispersión. La vía de dosificación para una proteasa no pancreática o composición que comprende una proteasa no pancreática puede ser cualquier vía de administración convencional, incluyendo, por ejemplo, vía oral, vía entérica, vía transdérmica o vía parenteral. Por último, una proteasa no pancreática o composición que comprende una proteasa no pancreática se puede administrar como una suspensión, comprimido, comprimido ranurado, comprimido recubierto, comprimido oblongo, cápsula o gragea.

Como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática es desde 5.000 a 1.000.000 de unidades de la farmacopea de los Estados Unidos (USP) de actividad proteasa por dosis. En una forma de realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasas no pancreática es desde 5.000 a 750.00 unidades USP de actividad proteasa por dosis. En aún otra forma de realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasas no pancreática es desde 5.000 a 500.00 unidades USP de actividad proteasa por dosis. En una forma de realización más preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasas no pancreática es desde 5.000 a 250.00 unidades USP de actividad proteasa por dosis. Para todos estos intervalos de unidades de actividad, una unidad USP de proteasa se define en el "Assay of Protease Activity" (U.S. Pharmacopeia/ National Formulary, USP 26/NF21, 2003 pg 1389-1391). Donde los métodos de tratamiento se llevan a cabo usando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una proteasa no pancreática, tal cantidad es una que proporciona una de las unidades de actividad anteriormente mencionadas de proteasa por dosis de formulación.

De forma alternativa, según esta invención, se administra una proteasa no pancreática o composición que comprende una proteasa no pancreática a un mamífero en una forma que tiene un nivel de proteasa activa de entre 20 mg a 500 mg por comida. En otra forma de realización, se administra una proteasa no pancreática o composición que comprende una proteasa no pancreática a un mamífero en una forma que tiene un nivel de proteasa activa de entre 50 mg a 500 mg por comida. En una forma de realización alternativa, se administra una proteasa no pancreática o composición que comprende una proteasa no pancreática a un mamífero en una forma que tiene un nivel de proteasa activa de entre 50 mg a 250 mg por comida. La actividad se mide como se ha definido anteriormente.

En una forma de realización alternativa, se administra una proteasa no pancreática o composición que comprende una proteasa no pancreática a un mamífero de modo que la dosis de proteasa activa total por comida sea entre 1 mg por kilo de peso corporal del mamífero y 10 mg por kg de peso corporal del mamífero, preferiblemente entre 1 mg por kilo de peso corporal del mamífero y 3 mg por kg de peso corporal del mamífero o preferiblemente entre 1 mg por kilo de peso corporal del mamífero y 2 mg por kg de peso corporal del mamífero.

Las proteasas no pancreáticas según esta invención pueden estar en forma cristalina, semicristalina o amorfa. Como se usa en el presente documento, el término "amorfo" incluye sólidos amorfos, así como líquidos. Las proteasas no pancreáticas se pueden cristalizar para formar materiales perfectamente cristalinos en estado sólido o pueden estar presentes como formas amorfas (completamente no cristalina) o semicristalinas (que tienen regiones cristalinas y amorfas) en estado sólido. Por ejemplo, los cristales muestran rasgos característicos incluyendo una estructura en red, formas y propiedades ópticas características, tal como índice de refracción. Un cristal consiste en átomos ordenados en un patrón que se repite periódicamente en tres dimensiones. Por otra parte, un sólido amorfo no tiene estructura en red molecular característica del estado sólido cristalino. Los cristales de proteasas no pancreáticas pueden estar en forma entrecruzada o no entrecruzada. Además, las formas amorfas de tales proteasas no pancreáticas también pueden estar en forma entrecruzada o no entrecruzada.

El término "nivel basal" o "concentración basal" se refiere al nivel o concentración de CCK en plasma en un paciente o mamífero particular después de ayunar durante la noche. Una vez que se ingiere comida, la concentración de CCK en plasma aumenta por encima del nivel basal, lo que a su vez, estimula que el páncreas secrete el jugo pancreático que incluye enzimas y bicarbonato.

Como se usa en el presente documento, la frase "concentración máxima en plasma (C_{max})" se refiere a la concentración pico en plasma medida después de la administración de comida. El valor para C_{max} se obtiene restando la concentración basal de la concentración pico en plasma.

Cuando se usa según una forma de realización de esta invención, el término "reducir" o "reducción" se refiere a un porcentaje de reducción en la C_{max} de un mamífero después de la administración de comida. Esta reducción se mide

comprando (a) la C_{max} en un mamífero después de la administración de comida en ausencia de una proteasa no pancreática respecto a (b) la C_{max} después de la administración de comida en presencia de una proteasa no pancreática. Si el porcentaje de reducción en C_{max} es del 100%, entonces la proteasa no pancreática “mantiene” una concentración de CCK a la concentración basal. Si el porcentaje de reducción es mayor del 100%, entonces la proteasa no pancreática reduce la concentración de CCK por debajo del nivel basal. Según otra forma de realización de esta invención, “reducir” o “reducción” se refiere a la reducción de la concentración de CCK relativa a la concentración basal en ausencia de administración de comida en un mamífero particular. Por ejemplo, una proteasa no pancreática que se administra en ausencia de comida puede reducir la concentración de CCK por debajo de la concentración basal. Esto se puede desear, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal, síndromes de malabsorción, infecciones agudas y crónicas y trastornos alimenticios, tales como anorexia nerviosa. En aún una forma de realización adicional de esta invención, el término “reducir” o “reducción” se refiere a cualquier reducción en la concentración de CCK en un mamífero particular medida en cualquier momento sin ayuno anterior a la administración de una proteasa no pancreática.

Las proteasas no pancreáticas para su uso en los métodos de esta invención también se pueden combinar con un excipiente. Según esta invención, un “excipiente” actúa como un relleno o una combinación de rellenos usados en composiciones farmacéuticas. Los excipientes preferidos incluidos en esta categoría son: sales de 1) aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, asparragina, glutamina, prolina, 2) hidratos de carbono, por ejemplo, monosacáridos tales como glucosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa; 3) disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, maltosa, sacarosa; 4) polisacáridos, tales como maltodextrinas, dextranos, almidón, glucógeno; 5) alditoles, tales como manitol, xilitol, lactitol, sorbitol; 6) ácido glucurónico, ácido galacturónico; 7) ciclodextrinas, tales como metilciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina y similares; 8) moléculas inorgánicas, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, fosfatos de sodio y potasio, ácido bórico, carbonato de amonio y fosfato de amonio; 9) moléculas orgánicas, tales como acetatos, citrato, ascorbato, lactato; 10) agentes emulsionantes y/o solubilizantes/estabilizantes como goma arábiga, dietanolamina, monoestearato de glicerilo, lecitina, monoetanolamina, ácido oleico, alcohol oleico, poloxámero, polisorbato, lauril sulfato de sodio, ácido esteárico, monolaurato sorbitano, monoestearato sorbitano y otros derivados sorbitanos, derivados de polioxilo, cera, derivados de polioxietileno; y 11) reactivos que aumentan la viscosidad como, agar, ácido algínico y sus sales, goma guar, pectina, alcohol polivinílico, óxido de polietileno, celulosa y sus derivados, carbonato de propileno, polietilenglicol, hexilenglicol, tiloxapol. Un grupo más preferido de excipientes incluye sacarosa, trehalosa, lactosa, sorbitol, lactitol, inositol, sales de sodio y potasio tales como acetato, fosfatos, citratos, borato, glicina, arginina, óxido de polietileno, alcohol polivinílico, polietilenglicol, hexilenglicol, metoxipolietilenglicol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, polilisina, poliarginina.

En una forma de realización de esta invención, el excipiente se selecciona del grupo que consiste en: sales, alcoholes, hidratos de carbono, proteínas, lípidos, tensioactivos, polímeros y poliaminoácidos. En otra forma de realización, el excipiente se selecciona del grupo que consiste en: protamina, alcohol polivinílico, ciclodextrinas, dextranos, poliaminoácidos, tales como poliarginina, polilisina y poliglutamato, polietilenglicol y dendrímeros, polímeros tales como policarbofilo y alginato.

Según esta invención, también se pueden combinar proteasas no pancreáticas con uno o más otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, enzimas, tales como amilasa y/o lipasa, preferiblemente producida en un huésped unicelular o microbiano o por técnicas de síntesis de péptidos convencionales.

Según la presente invención, las proteasas no pancreáticas, en forma cristalina o no cristalina, se pueden entrecruzar para impartir estabilidad a su estructura. Los entrecruzadores útiles incluyen, pero no están limitados a, los siguientes entrecruzadores multifuncionales, como se muestra en la tabla 2. Los procedimientos para el entrecruzamiento se pueden realizar según cualquier técnica de entrecruzamiento convencional.

Tabla 2 Entrecruzadores

Clase de entrecruzador	Entrecruzadores
Homobifuncionales	ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP); 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP); 3, 3'-ditiobispropionimidato-HCl de dimetilo (DTBP); bismaleimidohexano (BMH); bis[sulfosuccinimidil] suberato (BS); 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno (DFDNB); dimetilsuberimidato·2HCl (DMS); glutarato de disuccinimidilo (DSG); tartrato de disulfosuccinimidilo (Sulfo-DST); etilenglicolbis [sulfosuccinimidilsuccinato] (Sulfo-EGS); disulfuro de bis-(3-[4-azidosalicilamido]etil) (BASED); 1,4-di-(3'-[2'-piridilditio]propionamido) butano (DPDPB) y (Bis[2-(sulfosuccinimidooxicarbonilo)etil] sulfona (Sulfo-BSOCOES)
Heterobifuncionales	N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP); succinimidil-6-(3-[2-piridilditio] propionato)hexanoato (LC-SPDP); sulfosuccinimidil-6-(3-[2-piridilditio] propionato) hexanoato (Sulfo-LC-SPDP); N-(4-[p-azido-

Clase de entrecruzador	Entrecruzadores
	salicilamido]butil)-3'-(2'-piridilditio) propionamida (APDP); N-succinimidil(4-azidofenil)1,3'-ditiopropionate (SADP); sulfosuccinimidil(4-azidofenil) 1,3'-ditiopropionato (Sulfo-SADP); sulfosuccinimidil-2- (7-azido-4-meticumarin-3-acetamida)etil-1,3'-ditiopropionato (SAED); sulfosuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)etil-1,3'-ditiopropionato (SAND); sulfosuccinimidil-2-(p-azidosalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (SASD); succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (SMPB); sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (SulfoSMPB); 4-succinimidiloxycarbonil-metil- α -(2- piridiltio) tolueno (SMPT); sulfosuccinimidil-6-(α -metil-a-(2-piridiltio) toluamido)hexanoato (Sulfo-LC-SMPT); N-hidroxisulfo-succinimidil-4-azidobenzoato (Sulfo-HSAB); N-[γ -maleimido-butiriloxi] succinimida éster (GMBS); y NHS-PEG-Vinilsulfona (NHS-PEG-VS)
De orden cero	clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC); y Sulfo-NHS
Dialdehídos	glutaraldehído, succinaldehído, octanedialdehído y glioxal
Otros	halo-triacinas, halopirimidinas, anhídridos de ácidos mono- o dicarboxílicos alifáticos o aromáticos, haluros de ácidos mono- o dicarboxílicos alifáticos o aromáticos, compuestos de N-metilol, diisocianatos, diisotiocianatos y aciridinas

Métodos para mantener los niveles basales de CCK o reducir los niveles de CCK en plasma sanguíneo de mamíferos

- 5 Puesto que CCK es un péptido de mamífero abundante y ampliamente distribuido, muchas enfermedades o trastornos se pueden tratar ventajosamente manteniendo el nivel de CCK usando una proteasa no pancreática o composición de la misma según esta invención. Los estados de enfermedad que están o pueden estar mediados por CCK incluyen, pero no están limitados a, pancreatitis (aguda o crónica), malabsorción de proteínas (azotorrea), malabsorción de lípidos (esteatorrea), trastornos gastrointestinales, enfermedad de la vesícula biliar, accidente cerebrovascular ("ACV"), enfermedad gastroesofágica, enfermedad de úlcera péptica, gastrinomas, trastornos de motilidad intestinal, disfunción del esfínter de Oddi, colestitis, coledocolitiasis, cólico biliar, colangitis ascendente, trastornos alimenticios, obesidad, drogodependencia (CCK está altamente presente en el cuerpo estriado y la codistribución de sistemas de CCK y dopamina une la CCK endógena con recompensa, sensibilización psicoestimulante y propiedades de formación de hábitos de drogas en estado motivacional) (S. Leibowitz y B.G. Hoebel. En: *The Handbook of Obesity*, Bray et al., Eds. Marcel Dekker Inc. (2001)), trastornos relacionados con pánico/ansiedad (S. Rotzinger y F.J.P. Vaccarino. *J. Psychiatry Neurosci.* **28**, 171-181 (2003); Zwanzger et al. *Neuropsychopharmacol.* **25**, 699-703 (2001)), trastornos de estado de ánimo, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, depresión, funciones de atencional/memoria (para una revisión de todos los estados asociados a dopamina, véase F. Noble et al., *Pharmacological Reviews*, **51**, 745-781 (1999)), diabetes mellitus, taponamiento de conductos de alimentación tales como los conductos gástricos del yeyuno, etc., enfermedad de úlcera péptica, úlceras gástricas y duodenales y varias neuropatías periféricas (véase, L. Manni et al., *Br. J. Pharmacol.* **129**, 744-750 (2000)) incluyendo cáncer (los receptores CCK-B están presentes no solo en más del 90% de los casos de tiroides medular metastásico, sino en un alto porcentaje de cánceres de pulmón microcíticos, tumores ováricos estromales y potencialmente una variedad de otros tumores, incluyendo adenocarcinomas gastrointestinales, tumores neuroendocrinos y glioma maligno (Véase, en general, L. Manni et al., *Br. J. Pharmacol.* **129**, 744-750 (2000); M. Behe y TM Behr, *Biopolymers* **66**, 399-418 (2002)).

Según una forma de realización de esta invención, se pueden usar proteasas no pancreáticas para controlar el nivel de CCK en plasma sanguíneo de mamíferos después de la administración de alimentos. En una forma de realización, esta invención proporciona un método para tratar una enfermedad relacionada con CCK que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática. En una forma de realización alternativa, esta invención proporciona un método para mantener o reducir el nivel de CCK en plasma en un mamífero que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática.

La concentración basal de CCK en plasma sanguíneo típicamente se define como la concentración de CCK en plasma después de ayunar durante la noche. Una vez se ha ingerido una comida o un suplemento alimenticio, la concentración de CCK en plasma aumenta por encima del nivel basal, lo que produce estimulación pancreática y secreción de jugo pancreático, incluyendo enzimas y bicarbonato. Una forma de realización de esta invención se refiere a mantener o reducir la concentración de colecistocinina (CCK) en plasma en un mamífero durante un periodo de tiempo extendido después de la administración de comida.

De forma similar, esta invención proporciona métodos para reducir significativamente la concentración máxima en plasma (C_{max}) de CCK en un mamífero. En una forma de realización, esta invención se refiere a un método para la reducción de la concentración máxima en plasma (C_{max}) de colecistocinina (CCK) después de la administración de

alimentos en un mamífero que comprende el paso de administrar a dicho mamífero con los alimentos una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa pancreática, en donde dicha reducción se mide comparando (a) dicha C_{max} en ausencia de dicha proteasa después de la administración de alimentos con (b) dicha C_{max} en presencia de dicha proteasa después de la administración de alimentos, y en donde dicha reducción se selecciona del grupo que consiste en: (i) al menos una reducción del 10% hasta el 25%, (ii) al menos una reducción del 25% hasta el 50%, (iii) al menos una reducción del 50% hasta el 75%, y (iv) al menos una reducción del 75% hasta el 100%. De forma alternativa, la reducción puede ser cualquiera de al menos una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En una forma de realización preferida, la proteasa no pancreática se selecciona del grupo que consiste en seaprosa, serrapeptasa, pronasa, un componente de pronasa, o mezclas de las mismas. En aún otra forma de realización preferida, la proteasa es seaprosa.

En una forma de realización alternativa, los métodos de esta invención se refieren al tratamiento de una enfermedad relacionada con CCK en un mamífero administrando a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática, en donde el nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero después de administrar dicha proteasa es menor que o el mismo nivel que el nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero antes de la administración de dicha proteasa y permanece menor que o al mismo nivel durante un periodo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en (a) entre cero y 4 horas tras la administración, (b) entre cero y 8 horas tras la administración, y (c) entre cero y 12 tras la administración. De forma alternativa, ese periodo de tiempo se puede seleccionar de cualquiera de 4, 6, 8, 10 o 12 horas tras la administración.

En aún otra forma de realización, los métodos de esta invención se refieren a una reducción del nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero que comprende el paso de administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática.

Métodos para el tratamiento del dolor en mamíferos

Esta invención también proporciona métodos para su uso en el tratamiento de dolor en mamíferos usando una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática. Un beneficio de tal tratamiento contra el dolor es que el agente de proteasa activa no es adictivo, como son muchos otros agentes que reducen el dolor. Otro beneficio es que las proteasas no pancreáticas se pueden administrar de forma no invasiva, una vía no disponible con algunos métodos convencionales para tratar el dolor, por ejemplo, dolor asociado con pancreatitis crónica, tal como la colocación endoscópica de endoprótesis en el conducto pancreático y la administración intravenosa de alimentos.

Los métodos según esta invención se pueden usar para tratar un paciente que padece dolor asociado con insuficiencia pancreática, por ejemplo, dolor asociado con pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, fibrosis quística y cirugía gastrointestinal posoperatoria. Uno de tales métodos terapéuticos para tratar un individuo diagnosticado con pancreatitis, por ejemplo, comprende seleccionar un individuo que padece dolor abdominal, determinar la eficacia de la administración de la proteasa para el tratamiento del individuo basado en una medida de nivel de CCK en el plasma del individuo administrar una proteasa no pancreática al individuo basado en la determinación de la medida del nivel de CCK del individuo y seguir la mejora de los síntomas de dolor.

En otro aspecto, esta invención proporciona métodos para su uso en el tratamiento del dolor que comprenden administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática.

Métodos para el tratamiento del dolor abdominal en mamíferos

Como se ha discutido anteriormente, los alimentos pueden actuar como un sustrato de unión a tripsina respecto a la tripsina intraluminal. Esto a su vez previene que la tripsina degrade el péptido monitor y el CCK-RF intestinal, ambos de los cuales fomentan la liberación de CCK. El aumento en CCK posteriormente produce dolor.

Según una forma de realización de esta invención, la administración de una proteasa no pancreática a un mamífero mantiene el nivel basal de CCK en plasma sanguíneo o reduce el nivel de CCK en plasma sanguíneo después de la ingestión de alimentos. Como resultado, los métodos de esta invención son útiles para el tratamiento del dolor abdominal asociado con una variedad de enfermedades y trastornos gastrointestinales incluyendo, pero no limitados a, pancreatitis (aguda o crónica), malabsorción de proteínas (azotorrea), malabsorción de lípidos (esteatorrea), diabetes mellitus, enfermedad ulcerosa y combinaciones de las mismas, cólico biliar, colecistitis, colecistitis ascendente, colelitiasis, adiciones narcóticas, disfunción del esfínter de Oddi, vaciado gástrico retrasado y daño por quimioterapia. Los métodos de esta invención también son útiles para el antagonismo de CCK, reducción del hambre y tratamiento de anorexia.

Más particularmente, esta invención proporciona métodos para tratar el dolor abdominal en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática.

5 Como se ha descrito anteriormente, la concentración basal de CCK en plasma típicamente se define como la concentración de CCK en plasma en una paciente o mamífero particular después de un ayuno durante la noche. Una vez se ha ingerido o tomado una comida o suplemento alimenticio, la concentración de CCK en el plasma aumenta por encima del nivel basal, lo que produce estimulación pancreática y secreción de jugo pancreático, incluyendo enzimas y bicarbonato. Una forma de realización de esta invención se refiere a mantener las
10 concentraciones de colecistocinina (CCK) en plasma en un mamífero durante un periodo de tiempo extendido después de la administración de alimentos.

En una forma de realización, los métodos para uso de esta invención se refieren al tratamiento del dolor abdominal en un mamífero que comprende el paso de administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática, en donde un nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero después de administrar dicha proteasa es menor que o el mismo nivel que un nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero antes de administrar dicha proteasa y permanece menor que o al mismo nivel durante un periodo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en (a) entre cero y aproximadamente 4 horas después de administrar dicha proteasa; (b) entre cero y aproximadamente 8 horas después de administrar dicha proteasa; y (c) entre cero y aproximadamente 12 horas después de administrar dicha proteasa. De forma alternativa, ese periodo de tiempo se puede seleccionar de cualquiera de 4, 6, 8, 10 o 12 horas tras la administración.

Esta invención también proporciona métodos para reducir significativamente la concentración máxima en plasma (C_{max}) de CCK en un mamífero. Como se usa en el presente documento, la frase "concentración máxima en plasma (C_{max})" se refiere a la concentración pico en plasma medida después de la administración de comida. Según esto, una forma de realización de la invención se refiere a métodos para tratar el dolor abdominal en un mamífero que comprenden administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática, en donde la administración produce una reducción en el nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero después de dicha administración.

Todos los métodos para uso según esta invención se pueden llevar a cabo administrando la proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática al mamífero con o sin alimentos. En este, así como en otros métodos de la invención, la administración de la proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática con alimentos incluye la administración de alimentos actualmente con o posteriormente a la administración de la proteasa no pancreática en cada comida, empezando en medio de la comida o de forma alternativa, al final de la comida, bien una o dos o tres veces por comida. Otras formas de realización de esta invención se refieren a métodos para tratar el dolor abdominal en un mamífero que comprenden administrar a dicho mamífero con o sin alimentos una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una proteasa no pancreática, en donde dicha proteasa reduce la concentración máxima en plasma (C_{max}) de CCK en dicho mamífero comparado con la C_{max} de CCK en dicho mamífero sin que esté presente dicha proteasa durante la administración de los alimentos.

En aún otra forma de realización, esta invención se refiere a métodos para uso en el tratamiento del dolor abdominal en un mamífero que comprende el paso de administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática, en donde dicha proteasa produce la reducción en la concentración máxima en plasma (C_{max}) de colecistocinina (CCK) en dicho mamífero, en donde dicha reducción se mide comparando (a) dicha C_{max} en ausencia de dicha proteasa después de la administración de alimentos con (b) dicha C_{max} en presencia de dicha proteasa después de la administración de alimentos, y en donde dicha reducción se selecciona del grupo que consiste en (i) al menos una reducción del 10% hasta el 25%; (ii) al menos una reducción del 25% hasta el 50%; (iii) al menos una reducción del 50% hasta el 75%; y (iv) menos una reducción del 75% hasta el 100%. Esa reducción también puede ser al menos una reducción del 10% hasta el 100%. De forma alternativa, esa reducción puede ser cualquiera de al menos una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

55 Métodos de tratamiento de la anorexia en mamíferos

Después de la ingestión de alimentos, los niveles de CCK elevados crean la sensación de saciedad. Manteniendo un nivel en plasma de CCK reducido, los métodos según esta invención se pueden usar para tratar la anorexia. De forma similar, los métodos según esta invención se pueden usar para tratar malnutrición. En una forma de realización, esta invención proporciona un método para tratar la anorexia en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática o una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática.

65 Formas farmacéuticas de proteasas no pancreáticas

Cualquiera de los métodos para uso según esta invención se pueden llevar a cabo usando un comprimido de proteasa no pancreática sin recubrimiento entérico, que no contenga agentes supresores de ácidos.

En una forma de realización, los métodos de esta invención se refieren al uso de un comprimido de proteasa no pancreática sin recubrimiento entérico, que no contiene agentes supresores de ácidos, para el tratamiento del dolor abdominal que se asocia con la insuficiencia pancreática, y anorexia. En otra forma de realización, los métodos de esta invención se refieren al uso de un comprimido de proteasa no pancreática sin recubrimiento entérico, que no contiene agentes supresores ácidos, para la reducción de los niveles de colecistocinina (CCK) después de la administración de alimentos a un nivel basal que se mide antes de la administración de alimentos.

En una forma de realización según el método para uso de esta invención, el comprimido de proteasa no pancreática se administra a una dosis de entre uno y seis comprimidos, preferiblemente entre uno y dos comprimidos, lo más preferiblemente un comprimido, por comida, en donde el comprimido comprende un nivel de proteasa activa de entre 20 mg hasta 500 mg. En otra forma de realización, el comprimido de proteasa no pancreática según el método de uso de esta invención se administra a una dosis de entre uno y seis comprimidos, preferiblemente entre uno y dos comprimidos, lo más preferiblemente un comprimido, por comida, en donde el comprimido comprende un nivel de proteasa activa de entre 50 mg hasta 500 mg. De forma alternativa, el comprimido de proteasa no pancreática se administra a una dosis de entre uno y seis comprimidos, preferiblemente entre uno y dos comprimidos, lo más preferiblemente un comprimido, por comida, en donde el comprimido comprende un nivel de proteasa activa de entre 50 mg hasta 250 mg.

De forma alternativa, la proteasa no pancreática activa se administra a un mamífero como uno o más comprimidos que proporcionan una dosis de proteasa activa por comida que es entre 1 mg por kg de mamífero y 10 mg por kg de mamífero, preferiblemente entre 1 mg por kg de mamífero y 3 mg por kg de mamífero o entre 1 mg por kg de mamífero y 2 mg por kg de mamífero.

Ejemplos

Se usaron los siguientes materiales en los ejemplos mostrados a continuación.

Materiales

La seaprosa (SAP) cruda en polvo (CAS#9074-07-1) comercialmente disponible, derivada de *Aspergillus melleus*, se obtuvo de Amano Enzyme Inc., Japón (Nagoya, Japón). Se puede preparar SAP mediante un proceso de fermentación líquido o sólido. La SAP en polvo usada en los ejemplos de la presente invención se preparó mediante fermentación sólida. Se obtuvieron carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio de Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Se obtuvieron metanol, ácido trifluoroacético y acetonitrilo de Fisher Scientific (Pittsburg, PA) y el glutaraldehído se obtuvo de Aldrich (Milwaukee, WI). Se usó agua para inyección (WFI) o agua purificada de la farmacopea de los Estados Unidos (USP) para todos los tampones y soluciones de proteasas. Se puede encontrar una comparación de los estándares de agua WFI y USP en <http://www.purehts.com/USP.htm>. La dieta de pienso de laboratorio se obtuvo de Harlan Tekland. Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley de Charles River Laboratories (Raleigh, NC). Se obtuvieron ketamina y xilacina de Henry Schein. Se obtuvieron caseína (No. de catálogo C-5890), tripsina (No. de catálogo T-7309) e inhibidor de tripsina de soja (SBTI, No. de catálogo T-9003) de Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Se compraron Creon®-20 (Solvacy Pharmaceuticals, Hanover, Alemania) y Viokase®-8 (Axcan Scandipharm, Inc., Birmingham, Alabama) en una farmacia local. El péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅ (A.W. Spannagel, et al., *Regulatory Peptides* **73**, 161-164 (1998); A.W. Spannagel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 4415-4420 (1996)), se obtuvo de Specialty Enzymes and Biochemicals Co., Chino, CA (No. de catálogo B-031875, CAS 9031-94-1). Se compró pronasa de *Streptomyces griseus* de BioChemika/Fluka Chemical Corp., Milwaukee, WI (No. de catálogo 81748). Se compró Ensure®, alta proteína (24%) con sabor a vainilla, de una farmacia local. Se obtuvo celulosa microcristalina 103 de FMC International C. Irlanda. Se obtuvo cospovidona XL de ISP Technologies Inc. Wayne NJ. Col. Se obtuvo dióxido de silicio de Degussa Corporation, Parsippany, NJ. Se obtuvo talco de Luzenac America Inc. Englewood, CO. Se obtuvo estearato de magnesio NO-BOV de Mallinckrodt Baker Inc. Phillipsburg, NJ. Se obtuvo Encompress anhídrido de Penwest Pharmaceuticals, Cedar Rapids, IA.

Condiciones para la preparación de enzima para la hidrólisis in vitro de péptido liberador de CCK

Seaprosa (pH 6,0). Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de seaprosa en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1400 U/ml). A continuación, se añadió tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 1 ml de la solución de 1 mg/ml (1400 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 100 ml y una concentración final de 0,01 mg/ml (14 U/ml). Se añadió después tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 1,07 ml de la solución 0,01 mg/ml (14 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 1,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) con 25 µl de seaprosa 1,5 U/ml (0,15 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.

- 5 *Seaprosa (pH 4,5)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de seaprosa en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1400 U/ml). A continuación, se añadió tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 1 ml de la solución de 1 mg/ml (1400 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 100 ml y una concentración final de 0,01 mg/ml (14 U/ml). Se añadió después tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 2,5 ml de la solución 0,01 mg/ml (14 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 3,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) con 25 µl de seaprosa 3,5 U/ml (0,35 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.
- 10 *Serratiopeptidasa (pH 6,0)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de serratiopeptidasa en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1250 U/ml). A continuación, se añadió tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 1 ml de la solución de 1 mg/ml (1250 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 100 ml y una concentración final de 0,01 mg/ml (12,5 U/ml). Se añadió después tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 1,2 ml de la solución 0,01 mg/ml (12,5 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 1,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) con 25 µl de serratiopeptidasa 1,5 U/ml (0,15 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.
- 15 *Serratiopeptidasa (pH 4,5)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de serratiopeptidasa en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1250 U/ml). A continuación, se añadió tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 1 ml de la solución de 1 mg/ml (1400 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 100 ml y una concentración final de 0,01 mg/ml (12,5 U/ml). Se añadió después tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 2,8 ml de la solución 0,01 mg/ml (12,5 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 3,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) con 25 µl de serratiopeptidasa 3,5 U/ml (0,35 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.
- 20 *Pronasa (pH 6,0)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de pronasa en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1000 U/ml). A continuación, se añadió tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 1 ml de la solución de 1 mg/ml (1000 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 100 ml y una concentración final de 0,01 mg/ml (10 U/ml). Se añadió después tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 1,5 ml de la solución 0,01 mg/ml (10 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 1,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) con 25 µl de pronasa 1,5 U/ml (0,15 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.
- 25 *Pronasa (pH 4,5)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de pronasa en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1000 U/ml). A continuación, se añadió tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 1 ml de la solución de 1 mg/ml (1000 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 100 ml y una concentración final de 0,01 mg/ml (10 U/ml). Se añadió después tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 3,5 ml de la solución de 0,01 mg/ml (10 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 3,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) con 25 µl de pronasa 3,5 U/ml (0,35 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.
- 30 *Viokase-8 (pH 6,0)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de Viokase-8 en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (120 U/ml). A continuación, se añadió tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 0,125 ml de la solución de 1 mg/ml (120 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 1,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) con 25 µl de Viokase-8 1,5 U/ml (0,15 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.
- 35 *Viokase-8 (pH 4,5)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de Viokase-8 en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (120 U/ml). A continuación, se añadió tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 0,292 ml de la solución de 1 mg/ml (120 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 3,5 U/ml. Por último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) con 25 µl de Viokase-8 3,5 U/ml (0,35 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.
- 40 *Tripsina (pH 6,0)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de tripsina en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1130 U/ml). A continuación, se añadió tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) a 0,442 ml de la solución de 1 mg/ml (1130 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 50 U/ml. Por
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 6,0) con 25 µl de tripsina 50 U/ml (5 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.

- 5 *Tripsina (pH 4,5)*. Usando un matraz aforado, se disolvieron 10 mg de tripsina en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) hasta un volumen final de 10 ml, dando una solución que tenía una concentración final de 1 mg/ml (1130 U/ml). A continuación, se añadió tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) a 0,442 ml de la solución de 1 mg/ml (1130 U/ml) en un matraz aforado para dar un volumen final de 10 ml y una concentración final de 50 U/ml. Por
10 último, se mezclaron 225 µl de una solución 1 mg/ml de péptido liberador de CCK, LCRF₁₋₃₅, en tampón acetato de sodio (25 mM, pH 4,5) con 25 µl de tripsina 50 U/ml (5 U final) y se incubó a 37°C durante varios intervalos de tiempo.

Técnicas y ensayos analíticos

- 15 *Absorción UV-VIS y microscopia óptica*. Se obtuvieron espectrografías de UV-VIS en un espectrofotómetro Beckman DU 7400, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA. Se obtuvieron micrografías ópticas por imagen de campo brillante usando un microscopio Olympus BX-51 y capturadas por una cámara de vidrio digital en color Sony DXC-970MD 3CCD usando software Image-Pro, Media Cybernetics L.P., Silver Springs, Maryland, con aumentos de 40x a 400x.

- 20 *HPLC de fase reversa*. Los péptidos digeridos/hidrolizados del péptido liberador de CCK se separaron con un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con interfaz informático y software (Agilent Chemstation software) para la integración y análisis automático de picos cromatográficos. Se usó una columna de fase reversa Discovery C18 (100 x 2,1 mm, 3 µm) de Supelco para separar los péptidos digeridos. La elución con gradiente lineal de los péptidos (seguida a 214 nm y 280 nm) se logró usando un sistema de solvente compuesto de ácido trifluoroacético (TFA) al
25 0,1% en agua (solvente A) y TFA al 0,08% en acetonitrilo (solvente B) y con una velocidad de flujo de 0,25 ml/min a 30°C. La elución en gradiente fue como sigue: 0-3 minutos tampón B al 0%, 3-8 minutos (tampón B 0-70%), 38-40 minutos (tampón B al 70%) y 40-40,5 minutos (tampón B 70-0%).

- 30 *Purificación de CCK*. Se insertaron cartuchos Sep-Pak Vac 3 cc (500 mg) en un colector de extracción y se acondicionaron con 15 ml de metanol al 100%. Las columnas se equilibraron con 15 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en H₂O y se introdujeron tubos de centrifuga cónicos marcados en el colector de extracción para recoger el eluyente de carga/lavado de los cartuchos. A continuación se cargaron inmediatamente muestras de plasma sanguíneo después de la recogida de ratas para prevenir la degradación de la CCK. Los contaminantes se lavaron de la columna con TFA en H₂O. Los tubos de centrifuga cónicos marcados en el colector de extracción
35 recogieron el eluyente que contenía CCK de cada cartucho de Sep-Pak y la CCK se eluyó lentamente (velocidad de flujo < 1 ml/min) de la columna con TFA en acetonitrilo. Una vez se completó la elución, los tubos se cerraron y congelaron en nieve carbónica. Los contenidos se liofilizaron durante 24-48 horas usando un liofilizador y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Ejemplo 1

- Cristalización de seaprosa*. Se disolvió seaprosa cruda en polvo (100 g, aproximadamente pura al 70%) en 1000 ml de carbonato de sodio 10 mM, pH 9,50. La solución de seaprosa resultante se esterilizó por filtración en una campana pasándola a través de un filtro de 0,22 µm (Nalgene). La solución se agitó durante la noche en un agitador magnético a 4°C. Al día siguiente, los cristales resultantes se separaron de la solución centrifugando a 2.000 rpm (centrifuga Beckman modelo GS-6R con rotor basculante GH 3.8) durante 20 minutos y el sobrenadante se eliminó posteriormente. Los cristales se lavaron de nuevo con un volumen mínimo (80 ml) de carbonato de sodio 10 mM, pH 9,50 y se volvieron a centrifugar a 3.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante del lavado se eliminó después y los cristales se resuspendieron en un volumen total de 1,2 L (carbonato de sodio 10 mM, pH 9,50), Abs₂₈₀ = 34 mg/ml, y se formó una solución lechosa. Los cristales redisueltos se dejaron reposar durante 2-3 días a 4°C para recristalización adicional. El rendimiento final de los cristales de seaprosa purificados fue del 44% (véase la figura 1).

Ejemplo 2

- 55 *Entrecruzamiento de cristales de seaprosa*. El entrecruzamiento se llevó a cabo usando glutaraldehído (concentración final del 1%). Se trataron veinte ml de cristales de seaprosa, preparados anteriormente, (20 mg/ml en carbonato de sodio 10 mM, pH 9,5) con 800 µl de solución de glutaraldehído al 25% durante 24 horas a 4°C con rotación. La solución de cristales entrecruzados se concentró a una concentración final de 20-25 mg/ml en condiciones estériles. Después de 24 horas, los cristales se centrifugaron y lavaron (5X) con tampón Tris 10 mM, pH 7,0.
60

Ejemplo 3

- 65 *Respuesta de CCK en plasma a dieta con varios suplementos de enzimas exógenas en ratas*. Se dividieron aleatoriamente ratas, que pesaba cada una aproximadamente 350 gramos, que se habían enjaulado en grupos convencionalmente y dado acceso a agua y pienso de laboratorio *ad libitum*, en ocho grupos de tratamiento y

subdivididas adicionalmente en cinco cohortes, y cada cohorte tenía tres ratas. Todas las ratas ayunaron durante la noche (20-22 horas) y a la mañana siguiente (entre 7-9 am) se les administró por vía oral, posoperatoria (PO), 5 ml de líquido en el estómago a través de una aguja de alimentación unida a un tubo orogástrico. Las alícuotas de 5 ml se prepararon de componentes mostrados posteriormente para los grupos 1-8. Por ejemplo, el tratamiento para el grupo 1, vehículo, contenía 5 ml de agua, grupo 2, control caseína, contenía 900 mg de caseína en agua para dar una volumen final de 5 ml, grupo 3, caseína + cristales de seaprosa, contenía 900 mg de caseína más 144 mg (201.600 unidades USP) de cristales de seaprosa en agua, grupo 4, caseína + tripsina, contenía 900 mg de caseína más 1000 mg (1.250.000 unidades USP) de tripsina en agua, grupo 5, caseína + cristales de seaprosa entrecruzados, contenía 900 mg de caseína más 294 mg (201.600 unidades USP) de cristales de seaprosa entrecruzados en agua, grupo 6, caseína + inhibidor de tripsina de soja, contenía 900 mg de caseína más 2 mg de inhibidor de tripsina de soja en agua, grupo 7, caseína + Creon®-20 contenía 900 mg de caseína más 1000 mg (201.038 unidades USP) de Creon®-20 en agua, y grupo 8, caseína + Viokase®-8 contenía 900 mg de caseína más 1000 mg (104.500 unidades USP) de Viokase®-8 en agua. A continuación a las ratas se les dio una sobredosis intraperitoneal (ip) de 1 ml de ketamina:xilecina (mezcla de 10 ml de ketamina (100 mg) y 1 ml de xilecina (100 mg)) como anestesia, se abrió la cavidad torácica, y se sacó sangre mediante punción cardiaca del ventrículo derecho. Se obtuvieron muestras de plasma de cada rata usando una jeringuilla de 10 cc (calibre 16) y se recogió en tubos de sangre heparinizados durante la perfusión en los siguientes 5 puntos (véase la tabla 3): pretratamiento (en ayunas); 7,5, 15, 30 y 90 minutos tras el ensayo de administración de la formulación. Las muestras de sangre se separaron por centrifugación (10 min, 3000 rpm a 4°C) y se decantó en criotubos. Después se purificó CCK de plasma usando cartuchos Sep-Pak, como se ha descrito anteriormente. Los niveles de CCK se midieron por radioinmunoensayo (RIA) competitivo usando un antisuero muy específico generado contra sulfato de CCK-8 (<0,5% de reactividad cruzada a gastrina-17) y I¹²⁵ como rastreador (kit CCK RIA de Euro-Diagnostica). Los cambios en los niveles de CCK en plasma durante el tiempo después de la alimentación orogástrica de los varios líquidos de dieta se presentan en la tabla 3 y la figura 2. Los niveles más bajos (es decir, la mayor supresión) de CCK se produjo en ambos grupos tratados con seaprosa en las formulaciones de prueba.

Tabla 3. Niveles de CCK en plasma

Tiempo (min)	Vehículo control (agua)	Caseína	Caseína + cristales de seaprosa	Caseína + tripsina	Caseína + cristales de seaprosa entrecruzados	Caseína + SBTI	Caseína + Creon®	Caseína + Viokase®
Concentración de CCK en plasma (pM)								
0	0,18 0,17 0,26 0,20*	0,47 0,62 0,55 0,55*	0,64 0,73 0,42 0,60*	0,72 0,69 0,57 0,66*	0,66 0,58 0,71 0,65*	0,89 0,42 0,45 0,59*	0,72 0,88 0,53 0,71*	0,53 0,56 0,44 0,51*
7,5	0,77 0,84 0,87 0,83*	8,84 7,61 7,13 7,86*	0 0 0 0*	1,06 1,22 0,89 1,06*	0 0 0 0*	9,55 8,76 10,1 9,47*	5,20 5,71 4,55 5,15*	1,88 1,67 1,55 1,70*
15	0,12 0,23 0,32 0,22*	6,6 5,44 6,32 6,12*	0 0 0 0*	0,47 0,39 0,33 0,40*	0 0 0 0*	5,56 9,43 7,97 7,99*	4,33 3,87 4,62 4,27*	0,89 0,76 1,02 0,89*
30	0,11 0,21 0,00 0,11*	3,88 3,23 4,17 3,76*	0 0 0 0*	0,35 0,44 0,37 0,39*	0 0 0 0*	6,10 7,88 6,74 6,96*	3,94 3,13 3,88 3,65*	0,77 0,68 0,71 0,72*
90	0,00 0,00 0,19 0,06*	1,22 1,75 0,98 1,32*	0 0 0 0*	0,31 0,34 0,32 0,32*	0 0 0 0*	2,16 1,57 1,33 1,69*	2,31 2,11 1,78 2,07*	0,68 0,55 0,63 0,62*

* Valor medio de la concentración de CCK descrito para cada una de tres ratas por cohorte. Las ratas en este estudio se dividieron aleatoriamente en ocho grupos de tratamiento y además se subdividieron en cinco cohortes, con tres ratas en cada cohorte.

Ejemplo 4

Respuesta de CCK en plasma a dieta con varios suplementos de enzimas exógenas en ratas. Se dividieron aleatoriamente ratas, que pesaba cada una aproximadamente 350 gramos, que se habían enjaulado en grupos convencionalmente y dado acceso a agua y pienso de laboratorio *ad libitum*, en seis grupos de tratamiento y subdivididas adicionalmente en seis cohortes, y cada cohorte tenía tres ratas. Todas las ratas ayunaron durante la noche (20-22 horas) y a la mañana siguiente (entre 7-9 am) se les administró por vía oral (PO) 5 ml de líquido en el estómago a través de una aguja de alimentación unida a un tubo orogástrico. Las alícuotas de 5 ml se prepararon de

componentes mostrados posteriormente para los grupos 1-6. Por ejemplo, el tratamiento para el grupo 1, vehículo, contenía 5 ml de agua, grupo 2, control Ensure®, contenía 5 ml de Ensure®, grupo 3, contenía 143 mg o 200.000 unidades USP de cristales de seaprosa en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml, el grupo 4 contenía 57 mg o 80.000 unidades USP de cristales de seaprosa en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml, el grupo 5 contenía 14 mg o 20.000 unidades USP de cristales de seaprosa en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml, y el grupo 6 contenía 3,6 mg o 5.000 unidades USP de cristales de seaprosa en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml. A las ratas se les dio una sobredosis (ip) de 1 ml de ketamina:xilecina (como en el ejemplo 3) y se recogió sangre del tronco en tubos recubiertos con heparina durante la perfusión en los siguientes 6 puntos temporales (véase la tabla 4): pretratamiento [ayunas], 7,5, 15, 30, 60 y 90 minutos tras el ensayo de administración de la formulación. Se recogieron muestras de plasma de cada rata usando una jeringuilla de 10 cc (calibre 16) y se recogieron en tubos de sangre heparinizados. Las muestras de sangre se separaron por centrifugación (10 min, 3000 rpm a 4°C) y se decantaron en criotubos. Después se purificó CCK de plasma usando cartuchos Sep-Pak, como se ha descrito anteriormente. Los niveles de CCK se midieron por RIA competitivo usando un antisuero muy específico generado contra sulfato de CCK-8 (<0,5% de reactividad cruzada a gastrina-17) y ¹²⁵I como rastreador (kit CCK RIA de Euro-Diagnostica). Los cambios en los niveles de CCK en plasma durante el tiempo después de la alimentación orogástrica de los varios líquidos de dieta se presentan en la tabla 4 y la figura 3. Los niveles más bajos (es decir, la mayor supresión) de CCK fueron evidentes en esos grupos tratados con dosis mayores de cristales de seaprosa en las formulaciones de prueba.

Tabla 4. Niveles de CCK en plasma

Tiempo (min)	Vehículo control (agua)	Ensure®	Ensure® + seaprosa 200.000 U	Ensure® + seaprosa 80.000 U	Ensure® + seaprosa 20.000 U	Ensure® + seaprosa 5.000 U
Concentración de CCK en plasma (pM)						
0	0,342	0,000	0,362	0,362	0,362	0,362
	0,366	0,030	0,151	0,151	0,151	0,151
	0,439	0,270	0,100	0,100	0,100	0,100
	0,382*	0,098*	0,204*	0,204*	0,204*	0,204*
7,5	0,274	16,920	0,149	0,322	0,937	7,014
	0,418	20,510	0,141	0,341	0,837	6,630
	0,288	20,200	0,000	0,128	0,913	7,176
	0,327*	19,211*	0,096*	0,264*	0,896*	6,940*
15	0,238	6,900	0,083	0,129	0,466	4,042
	0,398	9,420	0,023	0,157	0,429	3,104
	0,274	11,430	0,000	0,146	0,556	2,149
	0,303*	9,247*	0,035*	0,144*	0,484*	3,098*
30	0,240	2,532	0,069	0,172	0,378	0,612
	0,425	4,704	0,070	0,161	0,323	0,604
	0,335	3,463	0,064	0,249	0,353	0,639
	0,333*	3,567*	0,068*	0,194*	0,351*	0,618*
60	0,201	1,578	0,013	0,018	0,280	0,344
	0,219	1,996	0,000	0,032	0,145	0,208
	0,290	2,624	0,000	0,026	0,131	0,186
	0,237*	2,066*	0,004*	0,025*	0,185*	0,246*
90	0,208	0,795	0,000	0,000	0,026	0,056
	0,146	0,734	0,000	0,000	0,000	0,289
	0,250	0,613	0,000	0,000	0,032	0,043
	0,201*	0,714*	0,000*	0,000*	0,019*	0,129*

* Valor medio de la concentración de CCK descrito para cada una de tres ratas por cohorte. Las ratas en este estudio se dividieron aleatoriamente en seis grupos de tratamiento y además se subdividieron en seis cohortes, con tres ratas en cada cohorte.

Ejemplo 5

Respuesta de CCK en plasma a dieta con varios suplementos de enzimas exógenas en ratas. Se dividieron aleatoriamente ratas, que pesaba cada una aproximadamente 350 gramos, que se habían enjaulado en grupos convencionalmente y dado acceso a agua y pienso de laboratorio *ad libitum*, en seis grupos de tratamiento y subdivididas adicionalmente en seis cohortes, y cada cohorte tenía tres ratas. Todas las ratas ayunaron durante la noche (20-22 horas) y a la mañana siguiente (entre 7-9 am) se les administró por vía oral (PO) 5 ml de líquido en el estómago a través de una aguja de alimentación unida a un tubo orogástrico. Las alícuotas de 5 ml se prepararon de componentes mostrados posteriormente para los grupos 1-6. Por ejemplo, el grupo 1, vehículo, contenía 5 ml de agua, el grupo 2, control Ensure®, contenía 5 ml de Ensure®, el grupo 3 contenía 3,6 mg o 5.000 unidades USP de cristales de seaprosa en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml, el grupo 4 contenía 21 mg o 5.000 unidades USP de cristales de seaprosa entrecruzados (seaprosa-CLEC) en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml, el

5 grupo 5 contenía 2 mg o 5.000 unidades USP de tripsina en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml, y el grupo 6 contenía 72,3 mg o 5.000 unidades USP de Viokase®-8 comercialmente disponible en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml. A las ratas se les dio una sobredosis (ip) de 1 ml de ketamina:xilecina (como en el ejemplo 3) y se recogió sangre del tronco (corazón) en tubos recubiertos con heparina en los siguientes 6 puntos temporales (véase la tabla 5): pretratamiento [ayunas], 7,5, 15, 30, 60 y 90 minutos tras el ensayo de administración de la formulación. Se obtuvieron muestras de plasma de cada rata usando una jeringuilla de 10 cc (calibre 16) y se recogieron en tubos de sangre heparinizados. Las muestras de sangre se separaron por centrifugación (10 min, 3000 rpm a 4°C) y se decantaron en criotubos. Después las muestras de plasma se procesaron en cartuchos Sep-Pak, como se ha descrito anteriormente. Los niveles de CCK se midieron por RIA competitivo usando un antisuero muy específico generado contra sulfato de CCK-8 (<0,5% de reactividad cruzada a gastrina-17) y I¹²⁵ como rastreador (kit CCK RIA de Euro-Diagnostica). Los cambios en los niveles de CCK en plasma durante el tiempo después de la alimentación orogástrica de los varios líquidos de dieta se presentan en la tabla 5 y la figura 4. Los niveles más bajos (es decir, la mayor supresión) de CCK fueron evidentes en esos grupos tratados con cristales de seaprosa en las formulaciones de prueba cuando se comparan con las otras formulaciones. Por ejemplo, se calcularon las reducciones en porcentaje en C_{max} como sigue: 0% (Ensure®), 93,92% (Ensure® + cristales de seaprosa), 85,56% (Ensure® + seaprosa-CLEC), 80,25% (Ensure® + tripsina), y 35,08% (Ensure® + Viokase®-8).

Tabla 5. Niveles de CCK en plasma

Tiempo (min)	Vehículo control (agua)	Ensure®	Ensure® + cristales de seaprosa 5.000 U	Ensure® + seaprosa-CLEC 5.000 U	Ensure® + tripsina 5.000 U	Ensure® + Viokase® 5.000 U
Concentración de CCK en plasma (pM)						
0	1,52	0,40	0,43	0,54	0,50	0,94
	1,48	0,46	0,27	0,26	0,58	0,69
	1,15	0,43	0,30	0,61	0,49	0,41
	1,39*	0,43*	0,34*	0,47*	0,53*	0,68*
7,5	1,69	30,35	5,37	5,77	6,70	18,68
	5,76	31,96	5,22	6,11	7,38	13,89
	2,66	23,61	4,15	9,22	11,06	26,95
	3,37*	28,74*	4,91*	7,03*	8,38*	19,84*
15	1,71	13,21	2,55	4,20	4,01	9,80
	2,57	9,66	2,06	5,36	6,58	5,17
	2,19	8,84	2,88	2,73	6,70	3,38
	2,16*	10,57*	2,50*	4,09*	5,76*	6,11*
30	1,29	3,57	2,00	1,88	3,19	2,43
	1,37	4,56	1,43	3,92	5,17	1,81
	1,44	3,07	1,16	1,34	2,26	2,37
	1,36*	3,73*	1,53*	2,38*	3,54*	2,21*
60	1,15	2,00	0,60	1,13	1,75	1,38
	1,57	3,62	0,92	0,67	1,03	0,93
	0,69	2,32	0,33	0,82	1,99	2,22
	1,13*	2,65*	0,62*	0,87*	1,59*	1,51*
90	0,33	2,10	0,32	0,51	1,10	1,13
	0,64	0,66	0,68	0,92	1,47	1,06
	0,50	1,90	0,58	0,78	1,07	0,37
	0,49*	1,55*	0,53*	0,74*	1,21*	0,85*

* Valor medio de la concentración de CCK descrito para cada una de tres ratas por cohorte. Las ratas en este estudio se dividieron aleatoriamente en seis grupos de tratamiento y además se subdividieron en seis cohortes, con tres ratas en cada cohorte.

25 **Ejemplo 6**

Respuesta de CCK en plasma a dieta con dosis repetidas de enzimas exógenas en ratas. Se dividieron aleatoriamente ratas, que pesaba cada una aproximadamente 350 gramos, que se habían enjaulado en grupos convencionalmente y dado acceso a agua y pienso de laboratorio *ad libitum*, en cuatro grupos de tratamiento y subdivididas adicionalmente en seis cohortes, y cada cohorte tenía cinco ratas. Todas las ratas se alimentaron con una dieta de pienso estándar *ad libitum* durante 3 días consecutivos. Además, las ratas del grupo 4 se alimentaron con 5 ml de Ensure® que contenía 20.000 unidades USP de seaprosa por sonda nasogástrica durante estos 3 días consecutivos (ratas tratadas). Todas las ratas ayunaron durante la noche (20-22 horas) y se alimentaron con 5 ml de la formulación líquida por instilación en el estómago a través de un tubo orogástrico entre 7-9 am del cuarto día. Las alícuotas de 5 ml se prepararon de componentes mostrados posteriormente para los grupos 1-4. Por ejemplo, el grupo 1, vehículo, contenía 5 ml de agua, el grupo 2, control Ensure®, contenía 5 ml de Ensure®, el grupo 3,

5 contenía 14 mg o 20.000 unidades USP de cristales de seaprosa en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml, el grupo 4 contenía 14 mg o 20.000 unidades USP de cristales de seaprosa en Ensure® para dar un volumen final de 5 ml (referencia a la tabla 6). A las ratas se les dio una sobredosis (ip) de 1 ml de ketamina:xilecina (como en el ejemplo 3) y se recogió sangre del tronco (corazón) en tubos recubiertos con heparina en los siguientes 6 puntos temporales (véase la tabla 6): pretratamiento [ayunas], 7,5, 15, 30, 60 y 90 minutos tras el ensayo de administración de la formulación. Se obtuvieron muestras de plasma de cada rata usando una jeringuilla de 10 cc (calibre 16) y se recogió en tubos de sangre heparinizados. Las muestras de sangre se separaron por centrifugación (10 min, 3000 rpm a 4°C) y se decantaron en criotubos. Las muestras de plasma se procesaron después en cartuchos Sep-Pak, como se ha descrito anteriormente. Los niveles de CCK se midieron por RIA competitivo usando un antisuero muy específico generado contra sulfato de CCK-8 (<0,5% de reactividad cruzada a gastrina-17) y I¹²⁵ como rastreador (kit CCK RIA de Euro-Diagnostica). Los cambios en los niveles de CCK en plasma durante el tiempo después de la alimentación orogástrica de los varios líquidos de dieta se presentan en la tabla 6 y la figura 5. Tanto los grupos 3 como 4 mostraron supresión comparable de los niveles de CCK, indicando de esta manera que la exposición anterior de las ratas a seaprosa no cambió el nivel de supresión de CCK. Por ejemplo, se calcularon las reducciones en porcentaje en C_{max} como sigue: 0% (Ensure®), 95,83% (Ensure® + cristales de seaprosa, inmediato), y 97,69% (Ensure® + cristales de seaprosa, repetido).

Tabla 6. Niveles de CCK en plasma

Tiempo (min)	Vehículo control (agua)	Ensure	Ensure + seaprosa 20.000 U	Ensure + seaprosa 20.000 U (ratas tratadas) [‡]
	Concentración de CCK en plasma (pM)			
0	0,00	0,05	0,00	0,22
	0,82	0,00	0,04	0,00
	0,34	0,37	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,33	0,00
	0,15	0,42	0,50	0,00
	0,26*	0,17*	0,17*	0,04*
7,5	0,52	26,78	1,25	1,08
	0,86	26,27	2,47	0,92
	0,43	26,84	0,94	1,16
	0,00	29,34	1,56	0,83
	0,00	34,87	1,53	1,11
	0,36*	28,80*	1,55*	1,02*
15	0,08	12,24	0,71	0,22
	0,50	12,70	0,05	0,32
	0,07	15,39	0,03	0,29
	0,50	7,97	0,00	0,47
	0,66	5,19	0,07	0,39
	0,36*	10,70*	0,17*	0,34*
30	0,08	3,57	0,00	0,05
	0,00	1,30	0,02	0,07
	0,28	4,33	0,27	0,00
	0,00	2,12	0,00	0,52
	0,27	1,51	0,03	0,06
	0,13*	2,57*	0,10*	0,14*
60	0,11	0,33	0,04	0,00
	0,06	0,04	0,09	0,06
	0,46	0,30	0,24	0,30
	0,00	0,21	0,12	0,16
	0,17	0,28	0,11	0,14
	0,16*	0,23*	0,12*	0,13*
90	0,04	0,14	0,11	0,06
	0,18	0,00	0,00	0,16
	0,11	0,20	0,12	0,29
	0,00	0,00	0,13	0,18
	0,39	0,10	0,09	0,00
	0,14*	0,09*	0,09*	0,14*

* Valor medio de la concentración de CCK descrito para cada una de tres ratas por cohorte. Las ratas en este estudio se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento y además se subdividieron en seis cohortes, con tres ratas en cada cohorte.

‡ Las ratas en el grupo 4 además de la dieta normal recibieron Ensure y seaprosa (20K) durante tres días antes del tratamiento final.

25

Ejemplo 7

5 *Hidrólisis in vitro del péptido liberador de CCK con varias proteasas a pH 6,0.* Se resuspendió péptido liberador de CCK (1 mg/ml) en tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 6,0 y se incubó con 0,15 unidades (unidades USP) de seaprosa (SAP) a 37°C en un baño de agua (véase anteriormente, Condiciones para la preparación de enzimas). A diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 2 y 4 horas), se inyectaron 10 µl de muestra en el sistema de HPLC de fase reversa Agilent 1100 y los péptidos digeridos se separaron en una columna de fase reversa C18 usando una elución en gradiente. El péptido liberador de CCK sin digerir eluyó a 22,8 minutos. La cantidad de péptido liberador de CCK sin digerir restante después de la digestión con proteasa se calculó a partir del área bajo el pico a 22,8 minutos y los resultados se muestran en la tabla 7. Se hicieron ensayos similares de hidrólisis de CCK usando proteasas como serratiopeptidasa, pronasa, tripsina o Viokase®-8 y los resultados se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Hidrólisis del péptido liberador de CCK a pH 6,0

Proteasa			Porcentaje de péptido liberador de CCK restante después de la hidrólisis con proteasa			
			Tiempo (horas)			
	Unidades	Peso (µg)	0	1	2	4
Seaprosa	0,15	0,100	100	71	46	17
Serratiopeptidasa	0,15	0,120	100	74	51	23
Pronasa	0,15	0,150	100	53	33	13
Tripsina	5,00	4,40	100	85	73	58
Viokase®	0,15	1,25	100	81	65	42

20 A pH 6,0, las proteasas fúngicas/bacterianas eran más activas que Viokase® o tripsina, que son ambas de origen pancreático, e hidrolizaron el péptido liberador de CCK más rápido que tripsina o Viokase®. Puesto que las enzimas fúngicas/bacterianas tienen mayor actividad específica que Viokase® o tripsina, es necesaria una menor cantidad de tales enzimas en una base por peso para hidrolizar el péptido liberador de CCK que de tripsina o Viokase®.

Ejemplo 8

25 *Hidrólisis in vitro del péptido liberador de CCK con varias proteasas a pH 4,5.* Se resuspendió péptido liberador de CCK (1 mg/ml) en tampón acetato de sodio 25 mM, pH 4,5 y se incubó con 0,35 unidades (unidades USP) de seaprosa (SAP) a 37°C en un baño de agua (véase anteriormente, Condiciones para la preparación de enzimas). A diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 2 y 4 horas), se inyectaron 10 µl de muestra en el sistema de HPLC de fase reversa Agilent 1100 y los péptidos digeridos se separaron en una columna de fase reversa C18 usando una elución en gradiente. El péptido liberador de CCK sin digerir eluyó a 20,6 minutos. La cantidad de péptido liberador de CCK sin digerir restante después de la digestión con proteasa se calculó a partir del área bajo el pico a 20,6 minutos y los resultados se muestran en la tabla 8. Se hicieron ensayos similares de hidrólisis de CCK usando proteasas como serratiopeptidasa, pronasa, tripsina o Viokase®-8 y los resultados se presentan en la tabla 8. A pH 4,5, las proteasas fúngicas eran más activas que Viokase® o tripsina, que son de origen pancreático, e hidrolizaron el péptido liberador de CCK más rápido que tripsina o Viokase®. Puesto que las enzimas fúngicas tienen mayor actividad específica que Viokase® o tripsina, es necesaria una menor cantidad en una base por peso para hidrolizar el péptido liberador de CCK

Tabla 8. Hidrólisis del péptido liberador de CCK a pH 4,5

Proteasa			Porcentaje de péptido liberador de CCK restante después de la hidrólisis con proteasa			
			Tiempo (horas)			
	Unidades	Peso (µg)	0	1	2	4
Seaprosa	0,35	0,223	100	81	71	60
Serratiopeptidasa	0,35	0,228	100	88	77	66
Pronasa	0,35	0,350	100	93	89	84
Tripsina	5,00	4,40	100	90	81	63
Viokase®	0,35	2,92	100	94	83	82

Ejemplo 9

45 *Determinación de la actividad enzimática de proteasas en estado comprimido y viabilidad de usar comprimidos de proteasas para el tratamiento del dolor.* En el tratamiento del dolor pancreático en seres humanos, la cantidad de proteasa por dosis por comida variará dependiendo de la gravedad del dolor en cada individuo. Hasta la fecha, los tratamientos actuales para el dolor pancreático implican administrar de 4 a 7 cápsulas por comida, 4 veces al día; las cápsulas típicamente comprenden un extracto enzimático pancreático porcino que contiene una mezcla de lipasa,

proteasa y amilasa, por ejemplo, Viokase®-16. En una pauta de cápsulas enzimáticas de Viokase®-16, por ejemplo, se administrarían aproximadamente desde 2 a 3,5 gramos de enzimas pancreáticas totales durante cada comida.

5 Las proteasas pancreáticas exógenas se deben administrar sin recubrimiento entérico para tener la actividad deseada en el duodeno (V. Singh et al., Gastroenterology Reports **5**, 110-116, (2003)). Sin embargo, ausente un recubrimiento entérico, las proteasas pancreáticas exógenas típicamente se administran con un agente supresor de ácido, tal como un inhibidor de la bomba de protones o un antagonista del receptor de H₂, para asegurar que la proteasa llega al duodeno con la actividad deseada (*Ibid.*, 113). Los inhibidores de la bomba de protones usados para este fin incluyen, por ejemplo, Omeprazol (Losec), Esomeprazol (Nexium), Lansoprazol (Zoton), Pantoprazol (Protium), Rabeprazol sódico (Pariet) y los antagonistas del receptor de H₂ incluyen, por ejemplo, Cimetidina (Tagamet, Dypamet), Famotidina (Pepcid), Nizatidina (Axid), Ranitidina (Zantac), Ranitidina citrato de bismuto (Pylorid).

15 Una de las ventajas de los métodos de esta invención es que la proteasa no pancreática se puede administrar como una forma sólida a un mamífero sin la necesidad de recubrimientos entéricos o de la adición de agentes supresores de ácido. Puesto que las proteasas derivadas de microbios, tal como las proteasas fúngicas, son más estables hacia el ácido del estómago que las enzimas pancreáticas, la necesidad de agentes supresores de ácido es mínima o inexistente.

20 Las proteasas convencionales usadas para controlar la digestión defectuosa típicamente se administran en forma de cápsula, ya que generalmente se cree que las proteínas no son estables durante la compresión de los comprimidos. La presente invención proporciona proteasas no pancreáticas en forma de un comprimido que permanecen activas sin un recubrimiento entérico y sin un agente supresor de ácido.

25 Para probar la viabilidad y actividad de los comprimidos de proteasas para el tratamiento de los métodos según esta invención, se realizaron las siguientes pruebas. Se prepararon tres formulaciones mostradas en la tabla 9 sacando seaprosa (*Aspergillus melleus*, SAP cristalina) de almacenamiento en frío y permitiendo que se calentara a temperatura ambiente durante menos de 2 horas. Se preparó una mezcla de placebo combinando todos los excipientes para una formulación determinada en una bolsa de polietileno y mezclado en seco. Por ejemplo, se preparó un comprimido de 200 mg midiendo y mezclando 140 mg de mezcla de placebo y 60 mg de seaprosa (81.600 unidades USP), transfiriendo esta mezcla a una cavidad del troquel de un aparato de perforación único y aplicando compresión a la mezcla para formar un comprimido. Se preparó seaprosa sin excipientes (forma pura) pesando 100 mg de seaprosa, transfiriéndolos a una cavidad del troquel de un aparato de perforación único y comprimiéndolos para formar un comprimido. Se determinó que una cantidad de 60 mg de seaprosa era una cantidad demasiado pequeña para ser comprimida por la herramienta de compresión usada (Máquina de compresión de comprimidos de perforación única, Modelo MTCM-I, Globepharm, Inc.).

Tabla 9. Preparación de comprimidos de seaprosa

Componente	Comprimido A peso/unidad o mg/comprimido	Comprimido B peso/unidad o mg/comprimido	Comprimido C peso/unidad o mg/comprimido
Seaprosa (SAP)	60,00	60,00	100,00
Celulosa microcristalina 103	114,00	-	-
Emcompress anhídrido	114,00	114,00	-
Crospovidona XL	20,00	20,00	-
Dióxido de silicio Col.	3,00	3,00	-
Talco	2,00	2,00	-
Estearato de Mg NO-BOV	1,00	1,00	-
Total	200,00	200,00	100,00
Fuerza de compresión (PSI)	1000	1000	1000
Dureza de los comprimidos (KP)	17,3	7,1	8,3

40

Tabla 10. Resumen de las actividades de los comprimidos

	Comprimido A	Comprimido B	Comprimido C
	Actividad (%)*		
Polvo (antes de la compresión)	103,6 ± 2,0	110,5 ± 3,9	110,2 ± 4,6
Comprimido (después de la compresión)	83,3 ± 1,5	90,3 ± 2,8	85,8 ± 1,4

* Las actividades proteasas se midieron usando el ensayo de proteasas USP referido en el presente documento. La actividad proteasa inicial fue 1439 unidades USP/mg. La composición de los comprimidos A, B y C se describe en la tabla 9.

45

REIVINDICACIONES

1. Una proteasa no pancreática seleccionada del grupo que consiste en seaprosa, pronasa y serrapeptasa para su uso en el tratamiento de dolor abdominal asociado con insuficiencia pancreática, pancreatitis aguda, fibrosis quística o cirugía gastrointestinal posoperatoria; dolor abdominal asociado con enfermedades y trastornos gastrointestinales seleccionados del grupo de malabsorción de proteínas (azotorrea), malabsorción de lípidos (esteatorrea), diabetes mellitus, enfermedades ulcerosas y combinaciones de las mismas; dolor abdominal asociado con cólico biliar, colecistitis, colecistitis ascendente, colelitiasis, adicciones narcóticas, disfunción del esfínter de Oddi, vaciado gástrico retrasado o daño por quimioterapia, o dolor abdominal asociado con anorexia en un mamífero.
2. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteasa no pancreática seleccionada del grupo que consiste en seaprosa, pronasa y serrapeptasa para su uso en el tratamiento de dolor abdominal asociado con insuficiencia pancreática, pancreatitis aguda, fibrosis quística o cirugía gastrointestinal posoperatoria; dolor abdominal asociado con enfermedades y trastornos gastrointestinales seleccionados del grupo de malabsorción de proteínas (azotorrea), malabsorción de lípidos (esteatorrea), diabetes mellitus, enfermedades ulcerosas y combinaciones de las mismas; dolor abdominal asociado con cólico biliar, colecistitis, colecistitis ascendente, colelitiasis, adicciones narcóticas, disfunción del esfínter de Oddi, vaciado gástrico retrasado o daño por quimioterapia, o dolor abdominal asociado con anorexia en un mamífero.
3. La proteasa no pancreática para su uso según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, en donde el nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero después de administrar dicha proteasa no pancreática o composición es menor que o el mismo nivel que un nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero antes de administrar dicha proteasa no pancreática o composición y permanece menor que o al mismo nivel durante un periodo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) entre cero y 4 horas después de administrar dicha proteasa no pancreática o composición;
 - (b) entre cero y 8 horas después de administrar dicha proteasa no pancreática o composición; y
 - (c) entre cero y 12 horas después de administrar dicha proteasa no pancreática o composición.
4. La proteasa no pancreática para su uso según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, en donde dicha proteasa no pancreática o composición produce una reducción en la concentración máxima en plasma (C_{max}) de colecistocinina (CCK) en dicho mamífero, en donde dicha reducción se mide comparando (a) dicha C_{max} en ausencia de dicha proteasa no pancreática o composición después de la administración de alimentos con (b) dicha C_{max} en presencia de dicha proteasa no pancreática o composición después de la administración de alimentos, y en donde dicha reducción se selecciona del grupo que consiste en:
 - (i) reducción del 10% al 25%;
 - (ii) reducción de 25% al 50%;
 - (iii) reducción del 50% al 75%; y
 - (iv) reducción de 75% al 100%
5. La proteasa no pancreática para su uso según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, en donde dicha proteasa no pancreática o composición produce una reducción en el nivel de colecistocinina (CCK) en plasma en dicho mamífero.
6. La proteasa no pancreática para su uso según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, en donde el dolor abdominal se asocia con anorexia en un mamífero.
7. La composición para uso según la reivindicación 2, en donde dicha composición comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: lipasa y amilasa.
8. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-7 en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha proteasa no pancreática es desde 5.000 a 1.000.000 de unidades USP por dosis.
9. La proteasa no pancreática para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5 y 6 o la composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde dicha proteasa no pancreática se entrecruza con un entrecruzador seleccionado del grupo que consiste en: entrecruzadores multifuncionales, entrecruzadores homobifuncionales, entrecruzadores heterobifuncionales, entrecruzadores de orden cero, entrecruzadores dialdehído, entrecruzadores halo-tricina, entrecruzadores halopirimidina, entrecruzadores anhídrido, entrecruzadores haluro, compuestos de N-metilol, entrecruzadores diisocianato, entrecruzadores diisotiocianato y entrecruzadores aziridina.

- 5
10. La proteasa no pancreática para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5 y 6 o la composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde dicha proteasa no pancreática o composición se administra a dicho mamífero por vía oral sin coadministración de un agente supresor de ácido.
- 10
11. La proteasa no pancreática para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5 y 6 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde dicha proteasa no pancreática o composición se administra a dicho mamífero en una dosis de entre uno y seis comprimidos por comida, en donde dicho comprimido comprende un nivel de proteasa no pancreática activa seleccionado del grupo que consiste en:
- 15
- (a) entre 20 mg y 500 mg;
(b) entre 50 mg y 500 mg; y
(c) entre 50 mg y 250 mg.
- 20
12. La proteasa no pancreática para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 5 y 6 o la composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde dicha proteasa no pancreática o composición se administra a dicho mamífero como uno o más comprimidos que proporcionan una dosis de proteasa no pancreática activa por comida seleccionada del grupo que consiste en:
- 25
- (a) entre 1 mg por kg de mamífero y 10 mg por kg de mamífero;
(b) entre 1 mg por kg de mamífero y 3 mg por kg de mamífero; y
(c) entre 1 mg por kg de mamífero y 2 mg por kg de mamífero.
- 30
13. La proteasa no pancreática para su uso según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, en donde el dolor abdominal se asocia con insuficiencia pancreática, pancreatitis aguda, fibrosis quística o cirugía gastrointestinal posoperatoria en un mamífero.
14. La proteasa no pancreática para su uso según la reivindicación 1 o la composición para su uso según la reivindicación 2, en donde el dolor abdominal se asocia con enfermedades y trastornos gastrointestinales seleccionados del grupo de malabsorción de proteínas (azotorrea), malabsorción de lípidos (esteatorrea), diabetes mellitus, enfermedades ulcerosas y combinaciones de las mismas; o dolor abdominal asociado con cólico biliar, colecistitis, colecistitis ascendente, colelitiasis, adicciones narcóticas, disfunción del esfínter de Oddi, vaciado gástrico retrasado o daño por quimioterapia.

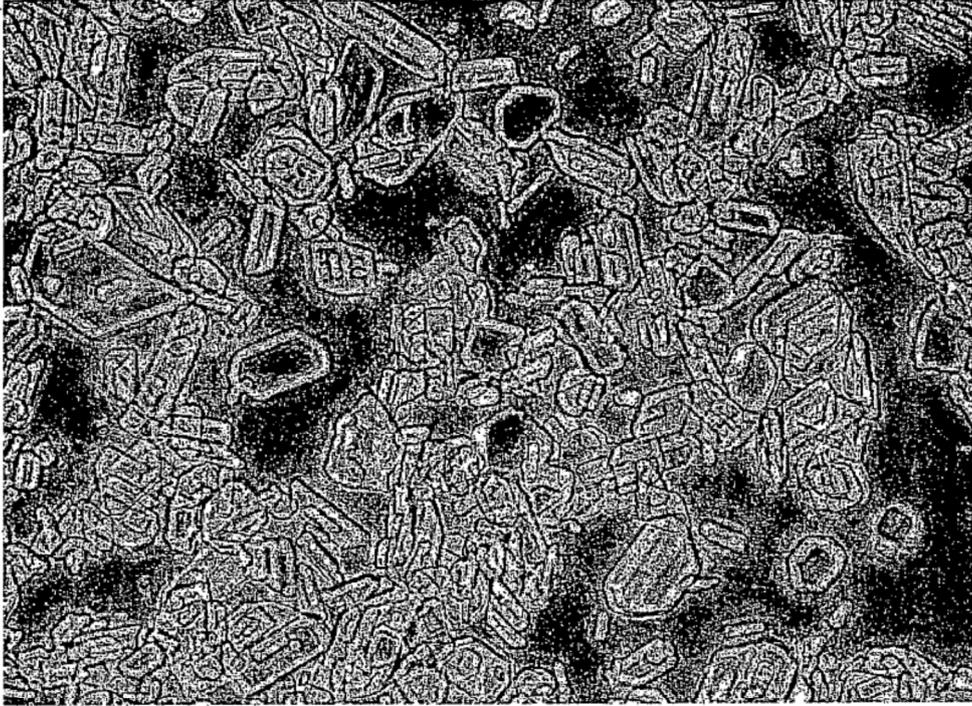


FIG. 1

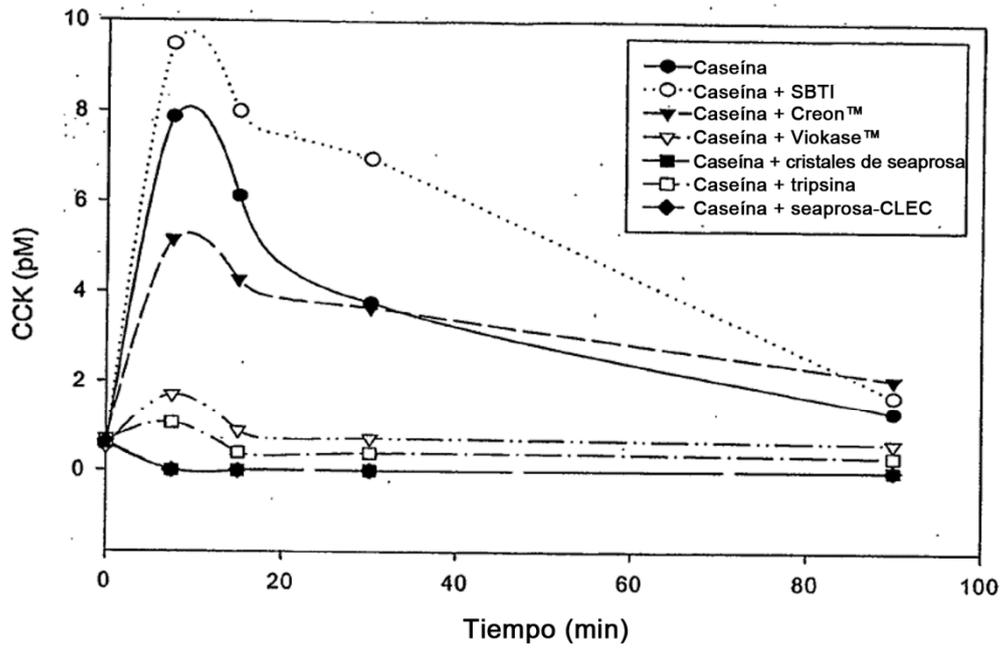


FIG. 2

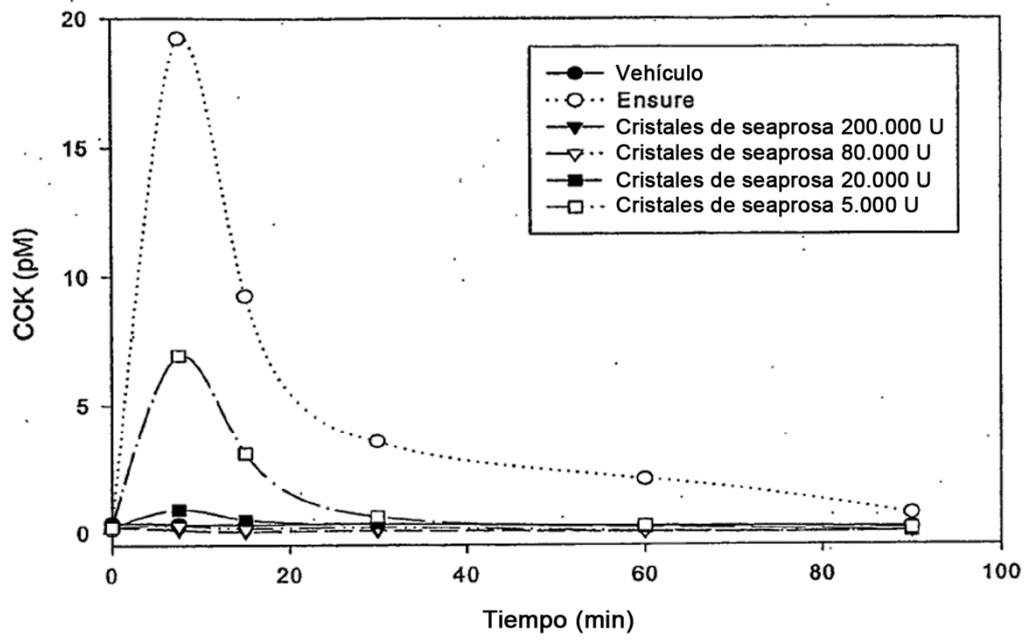


FIG. 3

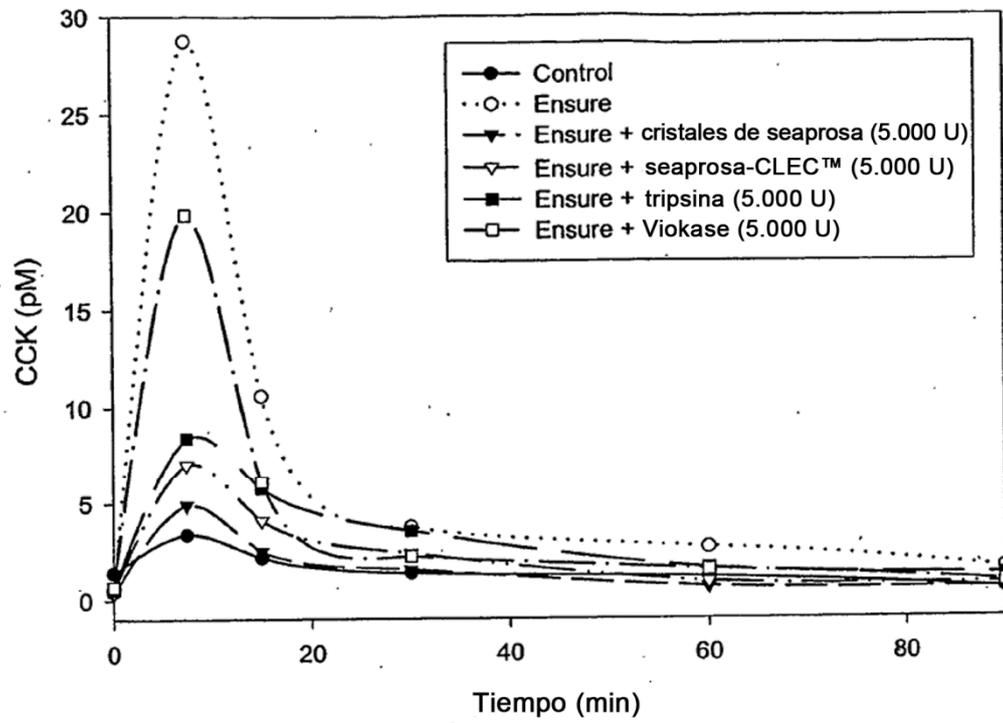


FIG. 4

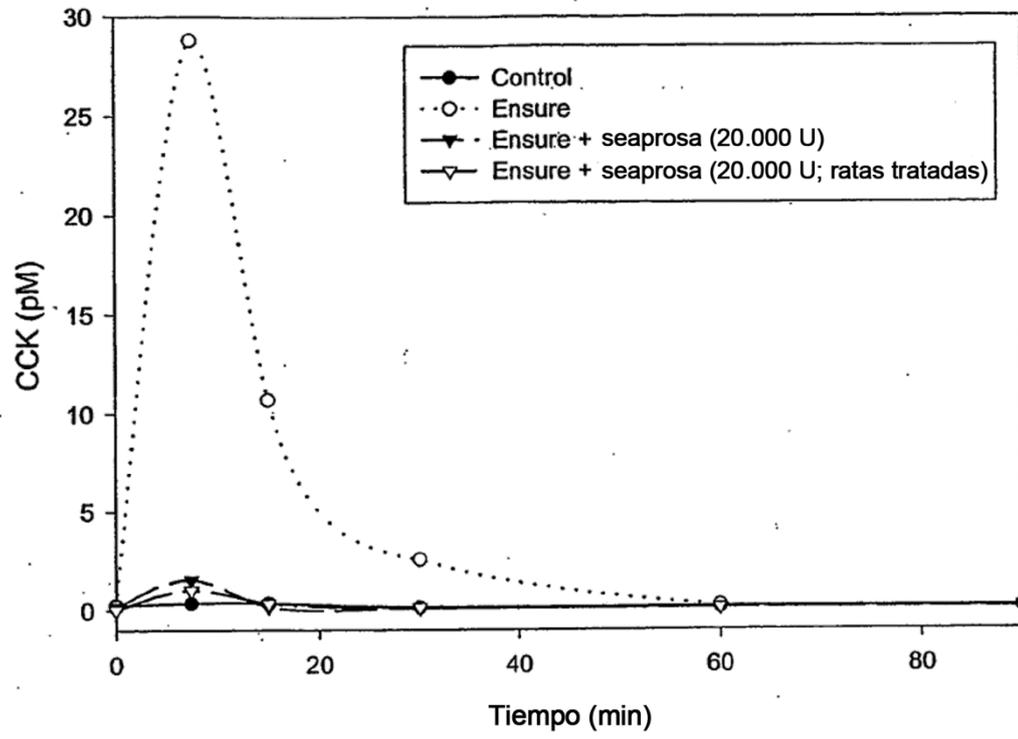


FIG. 5