(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 528 348**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008** **E 12192951 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2559439**

(54) Título: **Preparación farmacéutica para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna**

(30) Prioridad:

03.12.2007 AT 19622007

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2015

(73) Titular/es:

VOLOPHARM GMBH (100.0%)
Edisonstrasse 2
4600 Wels, AT

(72) Inventor/es:

DESSER, LUCIA;
LOTZ, BERNHARD y
MOHR, THOMAS

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

ES 2 528 348 T3

DESCRIPCIÓN

Preparación farmacéutica para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna

La presente invención se refiere a un medicamento para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna. La angiogénesis es el procedimiento por el cual la vasculatura preexistente se modifica para establecer una red compleja de nuevos vasos sanguíneos para soportar el tejido en crecimiento. En primer lugar, la liberación local de proteasas de la MEC por las CE degrada la membrana basal de los vasos sanguíneos. En segundo lugar, las CE activadas invaden el estroma, proliferan y forman estructuras tubulares que se unen. Finalmente la membrana basal se sintetiza de nuevo y los pericitos migran al sitio de los capilares recién formados. La angiogénesis juega un papel en una variedad de procedimientos fisiológicos (embriogénesis, cicatrización de heridas) y contribuye al progreso de varios trastornos patológicos (cáncer, hiperplasia). Normalmente, las células endoteliales en los mamíferos adultos están en reposo y se dividen sólo cada pocos años. En trastornos patológicos como la hiperplasia prostática benigna, la mastopatía, la artritis reumatoide, la arteriosclerosis, la endometriosis, la psoriasis, el cáncer o la neovascularización ocular, se observa un aumento muy importante de la multiplicación local de las células endoteliales.

La angiogénesis está regulada por un gran número de factores proangiogénicos y antiangiogénicos, que incluyen el factor de crecimiento placentario (PIGF), los factores de crecimiento de fibroblastos, las angiopoyetinas y otros. El principal paso limitante en este procedimiento, sin embargo, parece ser el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Originalmente descrito como el factor causante de una extravasación vascular sustancial y denominado factor de permeabilidad vascular (VPF), este factor de crecimiento fue denominado más tarde factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a causa de su efecto mitógeno en las células endoteliales.

En diferentes modelos in vitro e in vivo, se ha observado que el VEGF promueve el crecimiento celular vascular endotelial y la formación de vasos sanguíneos. El VEGF también sirve como un factor de supervivencia para las células endoteliales. In vitro, el VEGF impide la apoptosis inducida por la extracción de suero. La inhibición del VEGF en ratones neonatales, pero no en ratones adultos, conduce a grandes cambios apoptóticos en la vasculatura. La anulación del VEGF-A en ratones (ya sea la forma nula [VEGF-A-/-]) o heterocigótica [VEGF-A+/-]) tiene como resultado letalidad embrionaria entre el d 11 y el d 12 con anormalidad en el desarrollo, vascularización defectuosa en varios órganos y un número notablemente reducido de glóbulos rojos nucleados en los islotes sanguíneos del saco vitelino, lo que sugiere que el VEGF-A controla tanto la vasculogénesis como la hematopoyesis temprana. Finalmente, el VEGF induce la trasvasación vascular y fenestración endotelial en células endoteliales suprarrenales.

La expresión del VEGF puede ser inducida por hipoxia a través de la activación del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). La falta de oxígeno, causada por ejemplo por el crecimiento excesivo de tejido, activa la expresión de HIF-1. Posteriormente, los complejos HIF-1 se acumulan en el núcleo de la célula, se unen al sitio de unión HIF-1 del ADN e inician respectivamente la transcripción regulada al alza del ARNm del VEGF desencadenando un interruptor angiogénico que pueden provocar que los vasos sanguíneos adyacentes se conviertan en tejido hipóxico. Varias citocinas proinflamatorias también son capaces de inducir la expresión del VEGF, lo que explica el papel de la angiogénesis en enfermedades principalmente inflamatorias tales como la psoriasis o la artritis reumatoide.

Con el reconocimiento de este papel clave en la regulación de la angiogénesis, el VEGF y los receptores se han convertido en una diana terapéutica interesante. Se han utilizado varias estrategias para interferir con la angiogénesis mediada por el VEGF principalmente en el cáncer, aunque también en otras enfermedades caracterizadas por un aumento de la angiogénesis (por ejemplo, la degeneración macular o la hiperplasia prostática benigna). Los fármacos ensayados incluyen anticuerpos, conjugados de toxinas, péptidos que interfieren, receptores solubles e inhibidores de la tirosina quinasa. En conjunto, estos resultados sugieren que los fármacos dirigidos al VEGF mejorarán las futuras terapias en enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide, la psoriasis y la neovascularización ocular y otras.

La hiperplasia prostática benigna (HPB) se refiere al aumento del tamaño de la próstata en los hombres de mediana edad y de edad avanzada. Cuando es suficientemente grande, el agrandamiento de la próstata comprime el canal uretral y causa obstrucción parcial, a veces incluso completa de la uretra, inhibiendo de este modo el flujo normal de orina. En los casos graves, la glándula puede alcanzar hasta diez veces el tamaño normal. La HPB no es considerada como una lesión premaligna, pero puede convertirse en un gran problema de salud para los hombres mayores, debido principalmente a los efectos negativos sobre la calidad de vida, tales como dificultad para orinar, micción frecuente, aumento del riesgo de infecciones del tracto urinario y retención urinaria.

La HPB es un trastorno que progresa relativamente despacio, requiriendo décadas hasta que el paciente desarrolla síntomas relacionados con la enfermedad. Sin embargo, a la edad de 60 años, hasta el 50 % de la población masculina tiene HPB patológica. Verhamme et al., Eur Urol. 2002 octubre; 42(4):323-8 describe una tasa de incidencia de la HBP en 3/1000 hombre por año entre las edades de 45 y 49 años, llegando a un máximo de 38 casos por cada 1.000 hombres por año en el grupo de edad de 75 - 79 años. En los hombres mayores de 80 años, la tasa de incidencia se mantuvo constante.

En la actualidad hay tres opciones terapéuticas en el tratamiento de la HPB:

1. “Espera vigilante” se recomienda si los síntomas son leves y no afectan a la calidad de vida de un hombre. Los individuos también pueden seleccionar esta opción de tratamiento si creen que la farmacoterapia puede ser un inconveniente mayor que los síntomas de la HPB. Si se presentan síntomas y causan malestar, afectan a las actividades de la vida diaria, se recomienda el tratamiento farmacológico.
2. Los medicamentos se usan para aliviar los síntomas urinarios comunes asociados con la HPB, ya sea reduciendo el tamaño de la glándula prostática o frenando el crecimiento de la próstata (Madersbacher et al. Internist (Berl.). 2007 11 de abril). Las clases de medicamentos más frecuentes utilizadas para tratar los síntomas urinarios incluyen los bloqueadores α, como doxazosina (Cardura) [efectos secundarios: vértigo, somnolencia, mareos, cefalea, estreñimiento, pérdida de apetito, sequedad de boca, cansancio, congestión nasal, visión borrosa, ojos secos o dificultad para dormir], tamsulosina (Flomax) [efectos secundarios: disminución de la presión arterial que tiene como resultado síncope o desmayo; vértigo, cefalea, congestión nasal y palpitaciones], inhibidores de la 5-α reductasa, como finasterida (Proscar) [efectos secundarios: disminución de la cantidad de semen por eyaculación, disminución del deseo sexual, impotencia] o dutasterida (Avodart) [efectos secundarios: sensibilidad en los senos, disminución del deseo sexual, problemas de eyaculación, agrandamiento de las mamas en los varones, urticaria, impotencia, zonas irritadas, erupción].
3. En caso de síntomas severos de la HPB, como la retención urinaria recurrente, sangre recurrente en la orina, infecciones urinarias recurrentes o cálculos en la vejiga, el procedimiento de elección es la extirpación quirúrgica de la próstata (prostatectomía). Los efectos secundarios de la prostatectomía incluyen un riesgo adicional de infecciones, perforación de la vejiga, trombosis venosa profunda, e incontinencia total.

El documento WO 90/08555 se refiere al uso de enzimas hidrolíticas como proteasas tales como tripsina, quimotripsina o bromelaína para el tratamiento de la hipertrofia de prostata. La preparación de acuerdo con dicho documento se administra mediante una inyección intraprostática directa.

En el documento WO 2006/127431 se desvela un procedimiento de tratamiento de un individuo que sufre hipertrofia de próstata. En la causa de dicho tratamiento se administran enzimas de mamíferos como la tripsina.

El documento ZA 200002342 se refiere al uso de esterinas vegetales y a sus glucósidos para la prevención de la hipertrofia prostática benigna. A fin de aumentar la tasa de absorción de las esterinas vegetales, se añaden proteasas como la bromelaína a dichas composiciones farmacéuticas.

El documento US 2006/0024385 se refiere a composiciones que se aplican para reducir el estrés oxidativo. Dichas composiciones pueden comprender extractos vegetales que pueden contener, entre otras sustancias también bromelaína.

El documento US 2003/0194400 se refiere a composiciones que comprenden trombógeno vascular tisular selectivo que puede unirse al tejido asociado con la hiperplasia de próstata.

En el documento WO 94/019005 se desvela una composición farmacéutica que comprende una o más sustancias proteasas. En dicho documento las proteasas que se van a utilizar incluyen tripsina, quimotripsina, bromelaína, papaína y ficina.

Es un objeto de la presente invención proporcionar medicamentos para tratar o prevenir la hiperplasia prostática benigna que superen los inconvenientes de las formas de terapia y los medicamentos utilizados regularmente.

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 5 y se refiere a la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipertrofia/hiperplasia prostática benigna, en la que el medicamento se administra por vía oral.

Se observó sorprendentemente que la preparación de acuerdo con la presente invención permite, cuando se administra a un individuo, reducir significativamente (al menos 40 %, preferentemente al menos 50 %, más preferentemente al menos 60 %, incluso más preferentemente al menos 70 %, lo más preferentemente al menos 80 %, en particular al menos 90 %, en comparación con el nivel de VEGF de dicho individuo antes de la administración del medicamento de acuerdo con la presente invención) el nivel de VEGF y, por tanto, reducir la angiogénesis. La reducción de la angiogénesis es beneficiosa para prevenir y tratar la hiperplasia/hipertrofia prostática benigna en un individuo.

Este efecto es incluso más sorprendente debido a que el medicamento de acuerdo con la presente invención se administra por vía oral y la dosis de 1 a 100 mg de proteasa/kg de peso corporal (es igual a 3-300 unidades/kg de peso corporal) es baja. En la técnica anterior, en particular en el documento WO 90/08555, se sugiere inyectar proteasas directamente en la próstata con el fin de destruir el tejido hiperplásico. Sin embargo, la administración sistémica enteral no invasiva de proteasas a un individuo en una cantidad de acuerdo con la presente invención sorprendentemente resultó ser suficiente para tratar y prevenir la hiperplasia/hipertrofia prostática benigna aunque por supuesto aplicada en una dosis muy por debajo de la dosis que destruye el tejido humano (WO 90/08555). Una combinación de más de una proteasa, en particular, de al menos dos (preferentemente al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis), proteasas aumenta aún más el efecto terapéutico de prevención y/o tratamiento de la hiperplasia prostática benigna en un individuo.

Resultó sorprendente que la combinación de al menos dos proteasas permite tratar de manera más eficientemente la hipertrofia/hiperplasia prostática benigna que el uso de una sola proteasa.

La glándula de la próstata es dependiente de andrógenos y se requiere testosterona para su crecimiento normal, desarrollo, diferenciación y función normal y la privación de andrógenos reducirá el tamaño de la próstata. Las terapias anti-andrógenos para reducir el crecimiento excesivo de la próstata sólo tienen efectos limitados, por lo tanto, se propone que los esteroides puedan permitir en lugar de causar el crecimiento prostático. El crecimiento prostático ha mostrado que puede estar bajo el control inmediato de factores de crecimiento específicos como VEGF y TGF-beta y que puede ser modulado sólo indirectamente por los andrógenos.

La HPB se caracteriza por la hiperplasia del estroma de la próstata y las células epiteliales y una densidad elevada de microvasos (Stefanou et al. In Vivo 2004 Mar-Apr; 18(2):155-60). Los andrógenos estimulan el inicio de la hipertrofia de las células en la próstata. La hipertrofia puede dar lugar a lo largo del tiempo a hipoxia regional, la cual induce la expresión de factores de hipoxia (HIF-1 y HIF-2). El HIF estimula la síntesis de VEGF en las células epiteliales de la próstata (Walsh et al Prostatic Dis 2002; 5(2):119-22). El aumento de la expresión del VEGF puede inducir la angiogénesis y, en consecuencia, conducir a la progresión clínica de la HBP, lo que tiene como resultado la formación de grandes nódulos, bastante discretos en la región periuretral de la próstata. La interrupción de este continuo podría reducir la hiperplasia.

Por lo tanto, dirigirse específicamente al VEGF representa un posible enfoque terapéutico directo para la regulación del agrandamiento anormal de la próstata y también para la posible mejora de los síntomas asociados con la hiperplasia prostática benigna.

La concentración en suero de VEGF es elevada en la HPB en comparación con los controles sanos pero significativamente menor en comparación con los pacientes con cáncer de próstata (Trapeznikova et al. Vestn Ross Akad Med Nauk 2005; (5):14-6).

La angiogénesis es elevada en la HBP, es más pronunciada en el cáncer de próstata y se correlaciona con la concentración de VEGF (Stefanou et al. In Vivo 2004 Mar-Apr; 18(2):155-60). El anti-VEGF reduce la angiogénesis en la próstata de ratas castrados tratadas con testosterona (Lissbrant et al Prostate 2004 1 de enero; 58(1): 57-65).

De acuerdo con la presente invención, los términos “hipertrofia prostática benigna” e “hiperplasia prostática benigna” definen la misma enfermedad y, por lo tanto, se pueden utilizar dentro del alcance de la presente invención indistintamente.

La administración de proteasas de bacterias, hongos, plantas y animales no mamíferos es especialmente adecuada porque dichas proteasas no muestran una toxicidad significativa cuando entran en contacto con células humanas o animales, en particular con las células endoteliales. Incluso una combinación de proteasas como se divulga en el presente documento no es tóxica para un animal o ser humano, sino que actúa sobre la angiogénesis.

Curiosamente, se podría demostrar que las proteasas de mamíferos (es decir, seres humanos) no son capaces de inhibir de manera eficiente ni prevenir la angiogénesis. Por lo tanto, la única administración de tales proteasas a un individuo no puede ser utilizada para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con la neoangiogénesis.

El término “medicamento” como se define en el presente documento incluye no sólo los productos farmacéuticos, sino también los suplementos dietéticos.

Como se usa en el presente documento, por “proteasas vegetales” y “proteasas animales” se entiende proteasas de origen natural existentes en plantas o animales (animales no mamíferos) y que son extraídas u obtenidas de los mismos. Las “proteasas vegetales” y las “proteasas animales” también son proteasas recombinantes cuyo ADN codificante (por ejemplo, como ADNc) se deriva o se obtiene de una planta y animal (que comprende dicho ADN de forma natural en su genoma), respectivamente, y se clona en vectores apropiados y se expresa en un cultivo celular procariota (por ejemplo, bacteria) o eucariota (por ejemplo, células de insectos, células de mamíferos).

“Proteasas microbianas”, como se usa en el presente documento, son proteasas de origen natural que existen en los microorganismos, tales como bacterias y hongos (por ejemplo, levaduras, mohos). Dichas proteasas pueden, sin embargo, aislarse también de otras células u organismos, siempre que dichas células y organismos alberguen el ADN de la proteasa microbiana y sean capaces de producir dicha proteasa recombinante.

Se prefiere especialmente utilizar el medicamento de la presente invención para tratar individuos que sufren enfermedades causadas por niveles altos de VEGF y asociados a la angiogénesis, por lo que estas enfermedades no son principalmente ni están completamente asociadas con un aumento de la actividad proliferativa.

Estas proteasas pueden obtenerse mediante expresión recombinante en un hospedador o por extracción a partir de una planta que produce dichas proteasas de forma natural, por lo que el propio extracto puede utilizarse directamente para fabricar el medicamento de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos de extracción de las proteasas son bien conocidos en la técnica.

Bromelaína: Las piñas han tenido una larga tradición como planta medicinal entre los nativos de América del Sur y Central. La bromelaína se introdujo por primera vez en Europa como complemento terapéutico en 1957 y se utiliza principalmente en el tratamiento del edema y la inflamación (revisado por Maurer. Cell Mol Life Sci 58(9): 1234-1245, 2001.

Papaína: puede producirse como un material en bruto, desecado, recogiendo el látex de la fruta del árbol de la papaya. El látex se recoge después de rallar el cuello de la fruta, el cual se puede secar sobre la fruta o se puede hacer gotear en un recipiente. Este látex se seca a continuación. Ahora se clasifica como un material bruto desecado. Se necesita una etapa de purificación para eliminar las sustancias contaminantes. Esta purificación consiste en la solubilización y extracción de la enzima papaína activa.

Ficina: El látex de algunas especies de Ficus (Moraceae) se ha utilizado tradicionalmente como vermífugo en América Central y del Sur. Se ha aceptado que la actividad antihelmíntica se debe a una fracción proteolítica llamada ficina.

Proteasas vegetales: bromelaína, papaína, ficina, ananina, balansaína, caricaína, faustusaína, hieronimaína, karatasina, macrodontaína, pinguinaína, cucumisina, actinidina.

Proteasas bacterianas/microbianas: De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la proteasa aislada a partir de bacterias u hongos se selecciona del grupo que consiste en brinasa (de Aspergillus oryzae), natoquinasa (Bacillus subtilis natto), pronasa (Streptomyces griseus), seaprosa-S (Aspergillus melleus), serrapeptasa (Bacillus serratia E 15), esfericasa (Bacillus sphaericus), subtilisina (Bacillus subtilis) y mut-mutanasa (Aspergillus sp.).

Las proteasas microbianas se pueden obtener también por técnicas recombinantes o se pueden aislar directamente a partir de cultivos microbianos que comprenden los microorganismos que producen dichas proteasas. La natoquinasa, por ejemplo, se obtiene del natto, un alimento de la comida japonesa tradicional a base de soja fermentada, o mediante cultivos que comprenden organismos de una subespecie de Bacillus subtilis específica (Bacillus subtilis var. Natto), que son capaces de producir dicha proteasa.

La serrapeptasa también conocida como serrapeptidasa o serratiopeptidasa obtenida de los microorganismos Serratia E 15, que vive en la pared del intestino del gusano de seda y que la utiliza para facilitar la digestión y disolver su crisálida. Esta enzima se puede utilizar como un suplemento para tratar de forma natural el dolor y la inflamación y está en uso clínico en partes de Asia y Europa. La serrapeptasa se utiliza como una alternativa a los anti-inflamatorios no esteroides (AINES), que comúnmente se utilizan para tratar la artritis y la inflamación.

La proteasa animal (no de mamíferos) se aísla preferentemente del krill antártico (crustáceos) Euphasia superba, enzima de krill, batroxobina y lumbroquinasa de la lombriz de tierra, alfimerase, fibrolasa.

Otras proteasas preferidas son mutanasa, alfimerasa, fibrolasa, cucumisina, actinidina, ananina, balansaína, caricaína, fastusaína, hieronimaína, karatasina, pinguinaína y macrodontaína.

Estas proteasas pueden ser producidas de forma recombinante por procedimientos conocidos en la técnica o bien se pueden obtener directamente de los respectivos animales.

Las combinaciones de proteasas para ser utilizadas en el medicamento de acuerdo con la presente invención son:

bromelaína y papaína (opcionalmente con enzima de krill, brinasa, ficina, lumbroquinasa, natoquinasa, pronasa, seaprosa-S, serrapeptasa, esfericasa, subtilisina y/o batroxobina), bromelaína y ficina (opcionalmente con enzima de krill, brinasa, papaína, lumbroquinasa, natoquinasa, pronasa seaprosa-S, serrapeptasa, esfericasa, subtilisina y/o batroxobina), bromelaína y natoquinasa (opcionalmente con enzima de krill, brinasa, ficina, lumbroquinasa, papaína, pronasa, seaprosa-S, serrapeptasa, esfericasa, subtilisina y/o batroxobina) y papaína y ficina (opcionalmente con enzima de krill, brinasa, bromelaína, lumbroquinasa, natoquinasa, pronasa, seaprosa-S, serrapeptasa, esfericasa, subtilisina y/o batroxobina).

Estas combinaciones de proteasas se pueden combinar además con al menos una proteasa seleccionada de entre el grupo que consiste en mutanasa, alfimerasa, fibrolasa, cucumisina, actinidina, ananina, balansaína, caricaína, fastusaína, hieronimaína, karatasina, pinguinaína y macrodontaína.

Los medicamentos particularmente preferidos de la presente invención comprenden bromelaína en combinación con papaína, ficina, natoquinasa, brinasa, seaprosa, esfericasa, subtilisina, enzima de krill, batroxobina, lumbroquinasa.

En el medicamento de la presente invención, cada una de al menos dos proteasas está presente en una cantidad relativa de al menos 10 %, preferentemente al menos 15 %, en relación con la cantidad total de proteasas presentes en dicho medicamento.

Según otra realización preferida de la presente invención, las al menos dos proteasas están comprendidas en el medicamento en una cantidad de 5 a 10, preferentemente de 10 a 90 % p/p, preferentemente de 20 a 80 % p/p, más preferentemente de 30 a 70 % p/p.

La cantidad de proteasas administrada varía desde 3 hasta 300 U/kg de peso corporal, preferentemente de 6 a 150 U/kg de peso corporal, más preferentemente de 15 a 60 U/kg de peso corporal. Además, las proteasas se pueden administrar en una cantidad de 3 a 150 U/kg de peso corporal o de 3 a 60 U/kg de peso corporal. El medicamento puede comprender además preferentemente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyentes y/o excipientes, preferentemente un aglutinante, carga, un disgregante, un lubricante, un conservante y/o un revestimiento.

Dependiendo de la formulación farmacéutica del medicamento de acuerdo con la presente invención, se pueden usar otras sustancias como excipientes, revestimientos, etc.

El medicamento de la presente invención está adaptado para la administración oral.

Según una realización preferida de la presente invención, el medicamento se proporciona en una forma farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en gotas, pulverización, comprimidos, preferentemente comprimidos solubles, comprimidos efervescentes, comprimidos gastrorresistentes y comprimidos sublinguales, cápsulas, preferentemente cápsulas gastrorresistentes, polvos, gránulos, líquidos orales, gotas orales y supositorios.

El medicamento está adaptado para administración oral. Este modo de administración no es invasivo y, por lo tanto, permite una administración repetida (sin dañar al paciente) del medicamento según lo probado durante aproximadamente 50 años (Ransberger Erfahrungsheilkunde 1:14-17, 1971).

El medicamento de la presente invención se puede formular especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para la administración oral, por ejemplo, “pociones” (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la lengua.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen:

(1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa;
(2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata;
(3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa;
(4) tragacanto en polvo;
(5) malta;
(6) gelatina;
(7) talco;
(8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios;
(9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja;
(10) glicoles, tales como propilenglicol;
(11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol;
(12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo;
(13) agar;
(14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio;
(15) ácido algínico;
(16) agua exenta de pirógenos;
(17) solución salina isotónica;
(18) solución de Ringer;
(19) alcohol etílico;
(20) soluciones de tampón fosfato y
(21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en el medicamento de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen:

(1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloruro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares;
(2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares y
(3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma farmacéutica única variará dependiendo del hospedador que está siendo tratado y del modo particular de administración.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma farmacéutica única generalmente será aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico.

Los procedimientos de preparación de los medicamentos y formulaciones de acuerdo con la presente invención incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto. Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida aceite-en-agua o agua en aceite, o como un jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia), conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de una combinación de proteasa de la presente invención como principios activos.

Las proteasas de la presente invención también pueden administrarse como un bolo, electuario o pasta. En las formas farmacéuticas sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes:

(1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico;
(2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia;
(3) humectantes, tales como glicerol;
(4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio;
(5) agentes reatardantes de la solución, tales como parafina;
(6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario;
(7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol;
(8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita;
(9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos
y
(10) colorantes.

En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyentes inertes, conservantes, disgregantes (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con diluyentes líquidos inertes. Los comprimidos y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden estar opcionalmente ranurados o se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el principio activo(s) sólo, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal u, opcionalmente, de una manera retardada.

Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las proteasas también pueden estar en forma micro-encapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente. Formas farmacéuticas líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen

emulsiones farmacéuticamente aceptables, micro-emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, gérmen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitán polioxietilenados, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para administración rectal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mediante la mezcla de las proteasas de la invención con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en la cavidad del recto y liberarán el compuesto activo. Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración rectal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen vehículos tales como se conocen en la técnica por ser apropiados.

Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Las proteasas se pueden mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampones o propelentes que puedan ser necesarios.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de las proteasas de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar una liberación controlada de las proteasas de la presente invención en el cuerpo. Tales formas farmacéuticas se pueden preparar disolviendo o dispersando las proteasas en el medio apropiado. Los potenciadores de la absorción también pueden usarse para aumentar el flujo de las proteasas través de la piel. La tasa de tal flujo puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para la administración parenteral comprenden las proteasas de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes de usar, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de las partículas requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos sobre las composiciones objeto puede ser asegurada mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones.

Los niveles de administración reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de administración seleccionado dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad de la proteasa particular de la presente invención empleada, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las proteasas empleadas, la edad, peso, trastorno, salud general e historial

médico previo del paciente a tratar y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de las proteasas de la invención empleadas en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosis hasta que se consiga el efecto deseado.

Aunque es posible que las proteasas de la presente invención se administren solas, es preferible administrar las proteasas como una formulación farmacéutica (composición).

Según otra realización preferida de la presente invención, los medicamentos comprenden además al menos otro principio activo.

Dicho principio activo puede ser uno cualquiera que pueda apoyar la prevención y el tratamiento de enfermedades angiogénicas con las proteasas de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, por supuesto también es posible añadir principios activos que presentan otros efectos que dicha proteasas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

La Figura 1 muestra la liberación de LDH en el sobrenadante de las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con enzima.
La Figura 2 muestra un ensayo de MTT con HUVEC tratadas con enzima.
La Figura 3(A) muestra la Inhibición de la formación de tubos inducida por VEGF mediante la combinación de bromelaína 25 %, natoquinasa 50 % y papaína 25 %.
La Figura 3(B) muestra el control tratado sólo con VEGF. Mientras que en el control de VEGF es visible un patrón estrecho de tubos formados, la muestra tratada con enzima muestra amplias áreas sin formación de tubos que indican actividad antiangiogénica del cóctel de enzimas.
La Figura 4 muestra las concentraciones de VEGF en la sangre de los pacientes tratados con Rutozym.
La Figura 5 muestra un ensayo de MTT con HUVEC estimuladas por el VEGF y rutósido. No se observa inhibición de la proliferación.
La Figura 6 muestra los efectos tóxicos del rutósido en HUVEC. No se observaron efectos tóxicos en HUVEC quiescentes, mientras que las HUVEC activadas por el VEGF muestran un ligero efecto.
La Figura 7 (izquierda) muestra la inhibición de la formación espontánea de tubos en HUVEC. La bromelaína, la ficina, la natoquinasa, la papaína y la serrapeptasa, pero no la quimotripsina ni la tripsina inhibían la formación de tubos.
La Figura 7 (a la derecha) muestra la inhibición de la formación de tubos inducida por el VEGF en HUVEC. La bromelaína, la ficina, la natoquinasa, la papaína y la serrapeptasa, pero no la quimotripsina ni la tripsina inhibían la formación de tubos casi en el mismo grado que las HUVEC no tratadas.

Ejemplos:

HPB

Materiales:

La bromelaína del tallo de piña con una actividad de 3,51 U/mg se obtuvo de Sigma Aldrich, Austria. La natoquinasa con una actividad de 10.000 U/ml se adquirió en Japan Bio Science Laboratory Co, Ltd. La papaína de Carica papaya con una actividad de > 3 U/mg se obtuvo de Sigma Aldrich, Austria.

Procedimientos:

Ensayo de toxicidad

La actividad antiproliferativa de la bromelaína, la natoquinasa y la papaína se evaluó mediante un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de cultivos semi-confluentes se recogieron por tratamiento con tripsina, se sembraron a una densidad de 2500 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos, previamente recubiertas con fibronectina humana. Con el fin de permitir la fijación apropiada, las células se incubaron durante 24 horas en medio basal endotelial 2MV (Cambrex Biochemicals) que contiene suero de ternera fetal al 10 %, suplemento de crecimiento celular endotelial 60 µg/ml, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, ácido ascórbico y heparina. Después de la unión, las células se privaron de nutrientes incubando a 37°C/95 % de humedad en un medio de 199 + suero de ternera fetal (FCS) 10 % y sin factores de crecimiento. Después de 24 horas, el sobrenadante se reemplazó por medio 199 que contiene FCS al 10 %, VEGF y concentraciones variables de las enzimas. Después de un período de incubación de 48 horas, el sobrenadante se recogió y se realizó un ensayo de LDH de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Alemania): alícuotas de 50 µl de todos los pocillos se transfirieron a una placa de fondo plano de 96 pocillos (ensayo enzimático) fresca. El tampón de ensayo se añadió a la mezcla de sustrato y se mezcló suavemente. Se añadieron 50 µl de mezcla de sustrato reconstituido a cada pocillo. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de solución de parada a cada pocillo. Al cabo de una hora, se midió la densidad óptica a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. Los resultados se expresan como % de control no tratado.

Los resultados se muestran en la figura 1. Estos demuestran claramente que la bromelaína, la natoquinasa y la papaína hasta una concentración de 25 µg/ml no mostraban efectos tóxicos en HUVEC después de 2 días de incubación.

Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de la bromelaína, la papaína y la natoquinasa y sus mezclas se evaluó mediante un ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de cultivos semiconfluentes se recogieron por tratamiento con tripsina y se sembraron a una densidad de 1000 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos, previamente recubiertas con fibronectina humana. Con el fin de permitir la fijación apropiada, las células se incubaron durante 24 horas en medio basal endotelial 2MV (Cambrex Biochemicals) que contiene suero de ternera fetal al 10 %, suplemento de crecimiento celular endotelial 60 µg/ml, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, ácido ascórbico y heparina. Después de la unión, las células se privaron de nutrientes mediante incubación a 37°C/95 % de humedad en un medio de 199 + suero de ternera fetal (FCS) 10 % y sin factores de crecimiento. Después de 24 horas, el sobrenadante se reemplazó por medio 199 que contiene FCS al 10 % y concentraciones variables de bromelaína, natoquinasa o papaína. Las células se incubaron otras 48 horas a 37°C/95 % de humedad. El ensayo de MTT se llevó a cabo usando un kit EZ4U MTT (Biomedica, Austria; de acuerdo con las instrucciones del fabricante). La densidad óptica se midió a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. Los resultados se expresan como % de control no tratado o % de proliferación siendo 100 % la proliferación del control tratado con VEGF.

Los resultados de los experimentos de concentración-respuesta se muestran en la figura 2. Estos demuestran un efecto antiproliferativo claro de la bromelaína, la natoquinasa y la papaína, alcanzando la bromelaína y la papaína un crecimiento del 75 % a concentraciones tan bajas como 25 µg/ml. Tomados en conjunto con los resultados del ensayo de liberación de la LDH, estos datos apuntan a un efecto antiproliferativo claro, pero no a una actividad citotóxica de la bromelaína, la papaína o la natoquinasa en HUVEC.

Actividad antiangiogénica

La actividad antiangiogénica en HUVEC se evaluó mediante un ensayo de formación de tubo. La matriz del factor de crecimiento reducido Matrigel (Becton Dickinson, Viena) se descongeló a una temperatura de 4°C. Se pipetearon 50 µl por pocillo en una microplaca de 96 pocillos. La placa se dejó a 4°C durante 24 horas. Antes del experimento, la placa se incubó durante 30-60 minutos a 37°C para solidificar el gel. Las HUVEC se incubaron durante 24 horas con medio 199 que contiene FCS 2 %. Las células se recogieron por tratamiento con tripsina y se sembraron en microplacas de 96 pocillos recubiertas con Matrigel a una densidad de 10.000 células por pocillo. Los fármacos se añadieron a las concentraciones deseadas y las células se incubaron en ausencia o presencia de 5 ng de VEGF/ml. Después de otras 6 horas, se fotografiaron los pocillos. La longitud total de los tubos se determinó utilizando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, EE.UU.).

Resultados:

Resultados:

Ejemplo 1: Inhibición del crecimiento de HUVEC por enzimas

Los resultados de las mezclas se muestran en la tabla 1. Se puede observar un claro efecto antiproliferativo.

Tabla 1: Inhibición del crecimiento de HUVEC de combinaciones de bromelaína, natoquinasa y papaína en presencia de VEGF.

Bromelaína	Natoquinasa	Papaína	% Proliferación
0,00 %	0,00 %	100,00 %	75,45 %
75,00 %	0,00 %	25,00 %	89,09 %
16,67 %	16,67 %	66,67 %	91,82 %
25,00 %	75,00 %	0,00 %	94,55 %
66,67 %	16,67 %	16,67 %	96,82 %

Ejemplo 2: Formación de tubo de HUVEC incubadas con enzimas

Bromelaína, natoquinasa y papaína

Los resultados de los ensayos de formación de tubo de mezclas se muestran en la figura 3, así como en la tabla 2.

Tabla 2: Inhibición de la formación de tubo en % en HUVEC en presencia de VEGF. Los resultados se muestran como % de inhibición de la formación de tubo, siendo 0 % la formación de tubo en las muestras tratadas sólo con VEGF.

Bromelaína	Natoquinasa	Papaína	% inhibición de la formación de tubo
75,00 %	25,00 %	0,00 %	98,11 %
16,67 %	16,67 %	66,67 %	93,52 %
25,00 %	25,00 %	50,00 %	87,75 %
0,00 %	75,00 %	25,00 %	87,42 %
75,00 %	0,00 %	25,00 %	86,34 %
25,00 %	0,00 %	75,00 %	83,77 %
16,67 %	66,67 %	16,67 %	83,65 %
50,00 %	0,00 %	50,00 %	82,73 %
0,00 %	50,00 %	50,00 %	80,01 %
0,00 %	25,00 %	75,00 %	78,26 %
33,33 %	33,33 %	33,33 %	74,14 %
25,00 %	75,00 %	0,00 %	61,57 %
50,00 %	25,00 %	25,00 %	47,78 %
0,00 %	0,00 %	100,00 %	39,86 %

La Tabla 2 muestra las longitudes de tubo expresadas como % de inhibición de la formación de tubo.

Los resultados indican claramente que:

1. La formación del tubo es inhibida por mezclas de bromelaína, natoquinasa y papaína;
2. La combinación de bromelaína, natoquinasa y papaína tiene un efecto mayor que los fármacos solos.

La Figura 3(a) muestra la combinación bromelaína 25 %, natoquinasa 50 % y papaína 25 %. (B) muestra el control tratado con VEGF. Mientras que en el control de VEGF es visible un patrón estrecho de tubos formados (flechas), la muestra tratada con enzima muestra amplias áreas sin formación de tubo que indican actividad antiangiogénica del cóctel de enzimas.

Ejemplo 3:

La influencia de preparaciones que comprenden bromelaína en combinación con otras enzimas sobre las células endoteliales de próstata humana (HProsEC) se ha analizado de forma análoga al ejemplo 2, con modificaciones menores. Brevemente, las células se privaron de nutrientes durante 24 horas en medio basal endotelial-2 (MV) (Lonza, Verviers) suplementado con ácido ascórbico e hidrocortisona. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 por pocillo en microplacas de titulación de 96 pocillos recubiertas con Matrigel y se incubaron en ausencia o presencia de 5 ng de VEGF/ml con combinaciones de enzimas (bromelaína 100 % o enzima 50 % y bromelaína 50 % a 12,5 µg/ml total). Después de 6 horas, los tubos se fotografiaron y se midieron usando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, EE.UU.). Se han obtenido los siguientes resultados:

enzima + bromelaína % inhibición del tubo

Formación

gen enzima

% Inhibición de formación de tubos

enzima + bromelaína

Brinasa 21,00 % 81,00 %

Pronasa 94,25 % 99,00 %

Subtilisina 27,00 % 100,00 %

Estreptoquinasa 29,00 % 80,00 %

Proteasa Tipo X 96,70 % 100,00 %

Proteasa Tipo XIII 60,60 % 98,00 %

Bromelaína 68,00 % ---------

Tabla 4: Estos resultados muestran claramente que una combinación de proteasa que comprende bromelaína y otra proteasa conduce a un aumento de la inhibición de la formación del tubo.

Ejemplo 4: Formación de tubos de HUVEC en presencia de proteasas de animales

Proteasas de animales

Para ensayar si la formación de tubo se inhibe debido al desprendimiento de las células, las células HUVEC se trataron con tripsina y quimotripsina, dos enzimas proteolíticas ampliamente utilizadas en el desprendimiento de células. Los resultados se muestran en la tabla 3. Ni la quimotripsina ni la tripsina mostraron un efecto significativo.

Concentración [µg/ml]	Quimotripsina	Tripsina
0	100,00 %	100,00 %
2,5	112,40 %	112,82 %
5	95,94 %	112 23 %
10	81,16 %	95,22 %
20	131,18 %	127,87 %

Tabla 3: % de formación de tubo en HUVEC después del tratamiento con VEGF y tripsina o quimotripsina

Se detectó una disminución significativa de la proliferación en las células endoteliales umbilicales humanas después del tratamiento con bromelaína, natoquinasa y papaína solo o en combinación con rangos de concentración entre 25 y 100 µg/ml.

Se ha demostrado una toxicidad relativamente baja de bromelaína, natoquinasa y papaína, particularmente en las concentraciones que han demostrado exhibir un efecto antiproliferativo. Las concentraciones de hasta 50 µg/ml no mostraron ningún efecto tóxico en las HUVEC después de 2 días de incubación a 37°C.

Ejemplo 5: Influencia de la mezcla de enzimas sobre la concentración de VEGF en la sangre humana

En este ejemplo se estudió el efecto de una terapia enzimática (mezcla de natoquinasa, bromelaína, papaína) sobre la cantidad de concentración de VEGF en la sangre. Se pudo demostrar (véase los resultados a continuación) que la terapia enzimática reduce significativamente la concentración de VEGF elevada en la sangre humana.

El ensayo se realizó como un estudio piloto aleatorio, abierto, multicéntrico en 111 pacientes con diabetes tipo 2 de ambos sexos en dos grupos comparables paralelos. Cincuenta y cuatro pacientes recibieron Rutozym™ (natoquinasa (20 000 FU/g) 25 mg bromelaína (2450 GDU/g) 90 mg de papaína N.F. (2,400 unidades USP/mg). 100 mg, Marlyn Nutraceuticals, EE.UU.) durante 4 semanas. Las concentraciones de VEGF en el plasma de los pacientes fueron evaluadas antes de la suplementación y justo después de 4 semanas de suplementación.

Los pacientes sirvieron ellos mismos como autocontrol con sus valores iniciales.

Las concentraciones de VEGF en la sangre se separaron en 4 grupos diferentes (cuartiles; véase la figura 4): la concentración de VEGF en sangre de los pacientes antes de la terapia <50 ng/ml; (s50 = inicio <50 ng/ml; e50 = fin) s100: concentración de VEGF <100 ng/ml antes de la terapia; s200: <200 ng/ml antes de la terapia y s300:> 200 ng de VEGF antes de la terapia.

Se pudo demostrar que el uso de un medicamento de acuerdo con la presente invención que comprende las proteasas de la planta y/o fuentes microbianas se puede utilizar para reducir el nivel de VEGF en la sangre y, por lo tanto, ser utilizado para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la neoangiogénesis.

Conclusión

Las enzimas proteolíticas de origen vegetal, bacteriano y fúngico se pueden utilizar para tratar la hipertrofia prostática benigna de mamíferos para reducir la progresión y para causar la regresión del tejido de la próstata hipertrofiada y con ello proporcionar remedio de los síntomas obstructivos asociados con la enfermedad.

La terapia oral con enzimas reduce la concentración elevada de VEGF en pacientes diabéticos pero no tiene ninguna influencia sobre el nivel normal de VEGF.

Las enzimas proteolíticas reducen la formación de tubo en HUVEC inducida por VEGF.

La terapia enzimática inhibe los factores de crecimiento angiogénicos que conducen a la reducción de la vascularización y esta es la base de su acción en la reducción de la hipertrofia-hiperplasia prostática benigna.

REIVINDICACIONES

1. Preparación farmacéutica que comprende al menos dos proteasas para su uso en el tratamiento de la hipertrofia/hiperplasia prostática benigna, en la que la preparación es administrada por vía oral y las al menos dos proteasas son seleccionadas del grupo que consiste en bromelaína, papaína y ficina.

2. Preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** la preparación comprende además al menos un vehículo, diluyente y/o excipiente, farmacéuticamente aceptable, preferentemente un aglutinante, una carga, un disgregante, un lubricante, un conservante y/o un revestimiento.

3. Preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** la preparación es proporcionada en una forma farmacéutica seleccionada de entre el grupo que consiste en comprimidos, preferentemente comprimidos gastrorresistentes y comprimidos sublinguales, cápsulas, preferentemente cápsulas gastrorresistentes y gránulos.

4. Preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** la preparación comprende además al menos otro principio activo.

5. Preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada porque** el al menos otro principio activo es un flavonoide y/o un antioxidante.

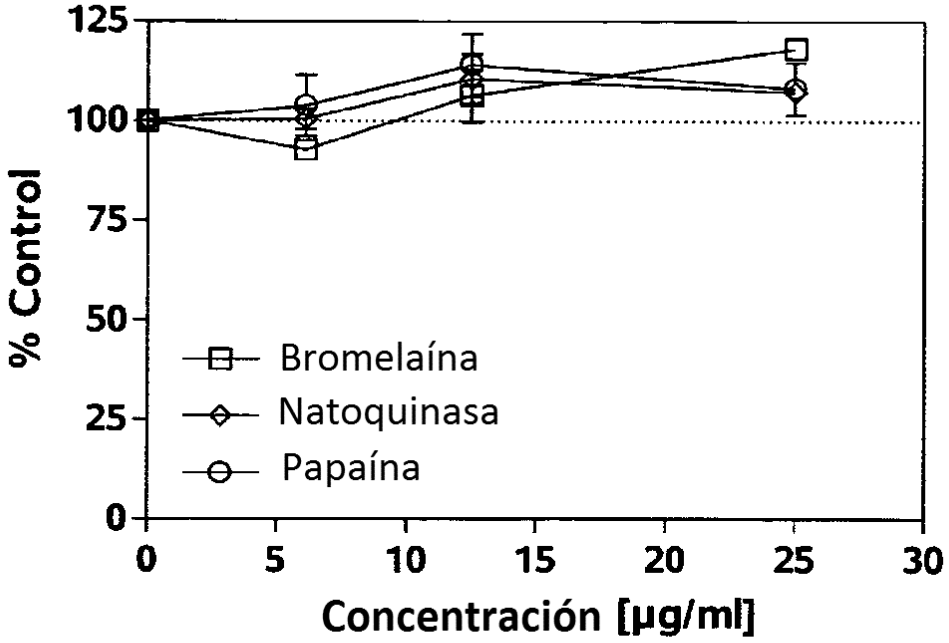
125
100
75
50
25
0
% Control
Bromelaína
Natoquinasa
Papaína
0
5
10
15
20
25
30
Concentración [µg/ml]

Fig. 1

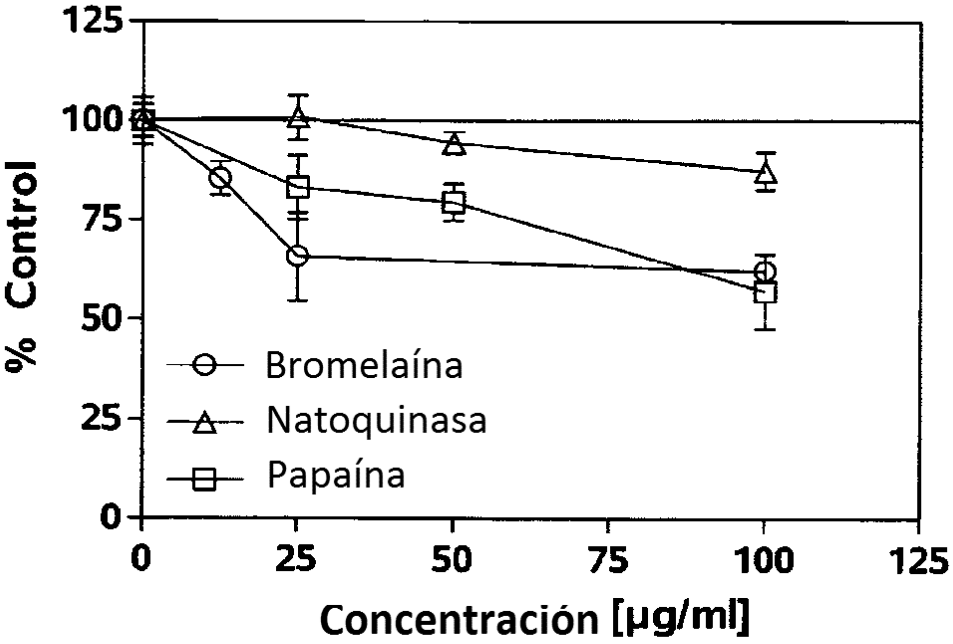
125
100
75
50
25
0
% Control
Bromelaína
Natoquinasa
Papaína
0
25
50
75
100
125
Concentración [µg/ml]

Fig. 2

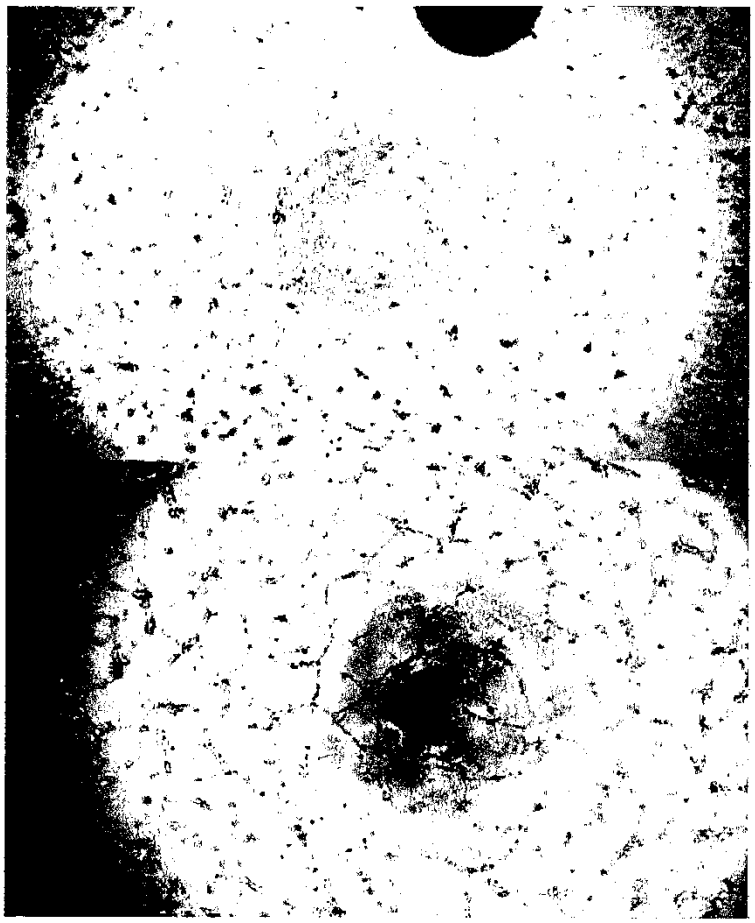

Fig. 3

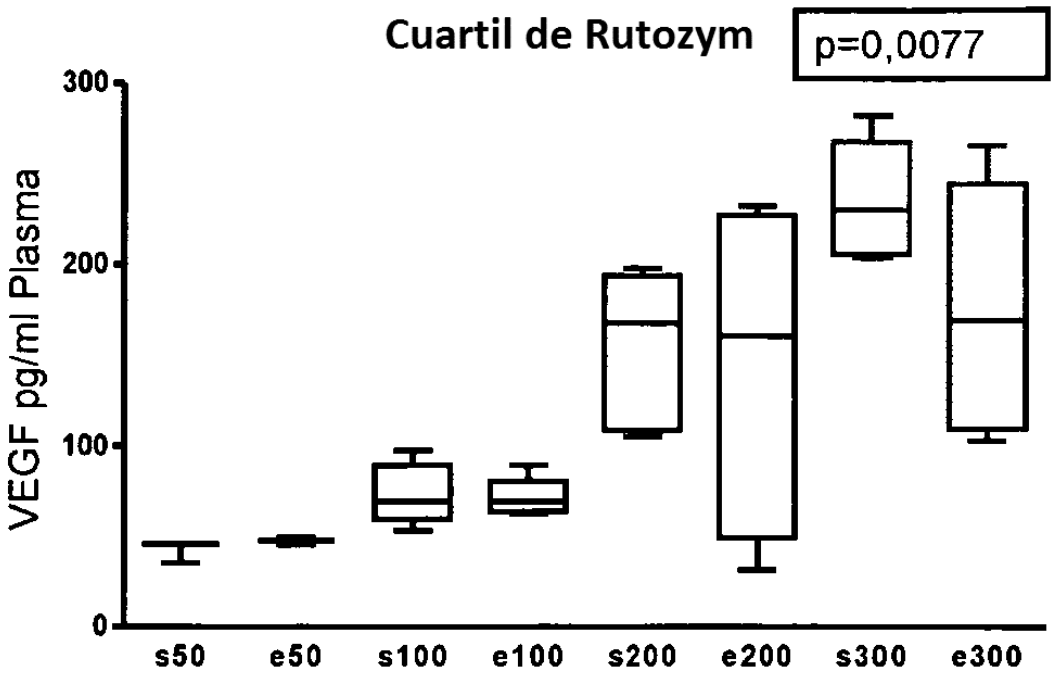
Cuartil de Rutozym
p=0,0077
VEGF pg/ml Plasma
300
200
100
0
s50
e50
s100
e100
s200
e200
s300
e300

Fig. 4

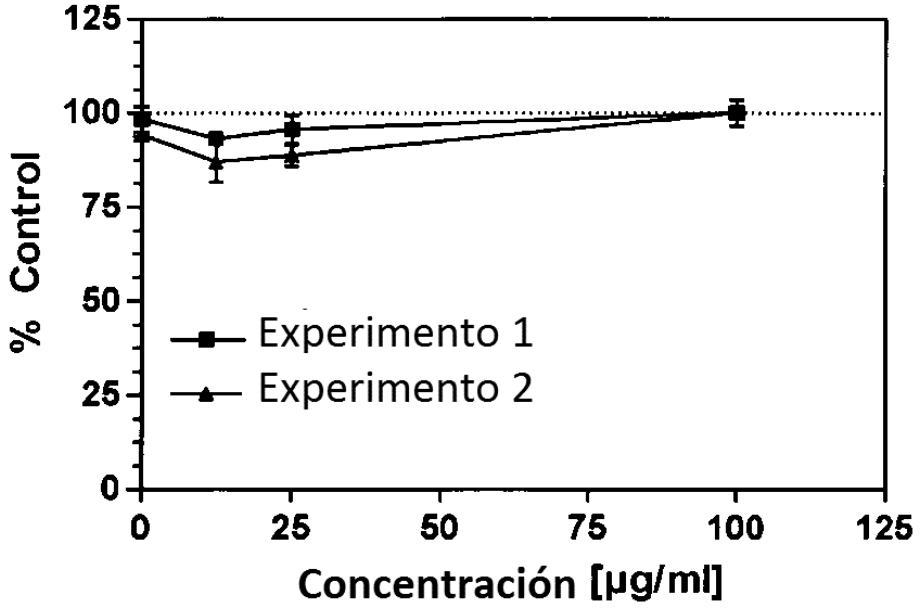
125
100
75
50
25
0
% Control
Experimento 1
Experimento 2
0
25
50
75
100
125
Concentración [µg/ml]

Fig. 5

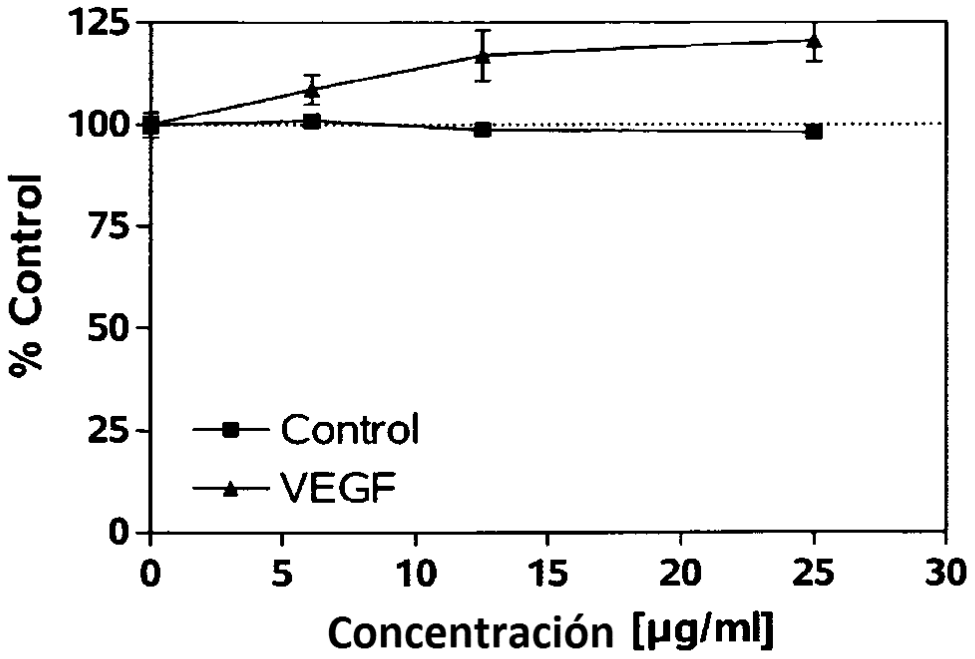
125
100
75
50
25
0
% Control
Control
VEGF
0
5
10
15
20
25
30
Concentración [µg/ml]

Fig. 6

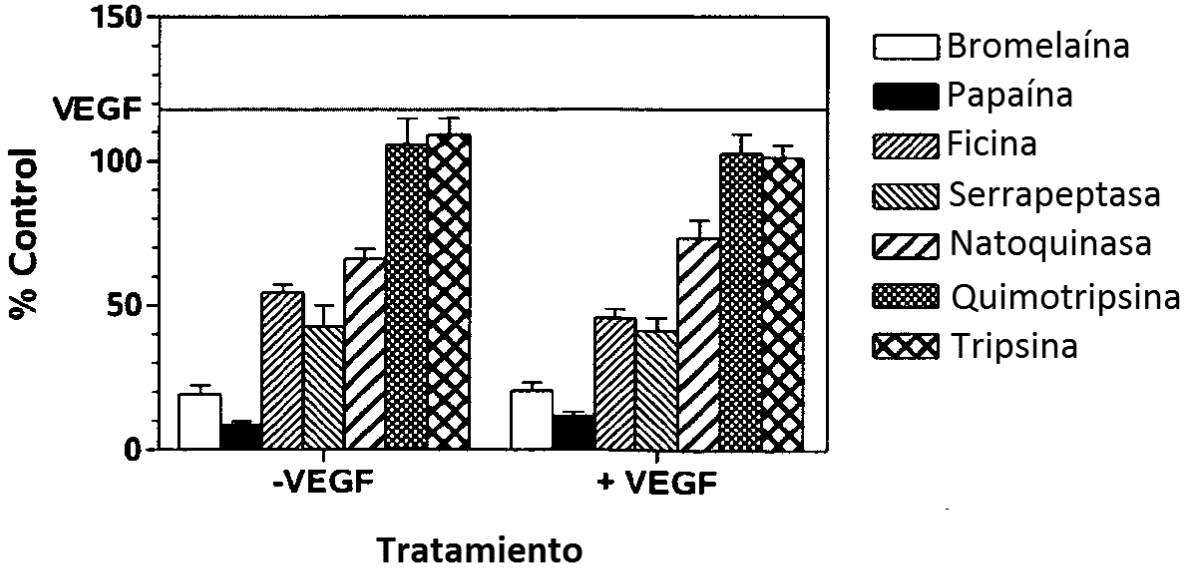
150
VEGF
100
50
0
% Control
-VEGF
+ VEGF
Tratamiento
Bromelaína
Papaína
Ficina
Serrapeptasa
Natoquinasa
Quimotripsina
Tripsina

Fig. 7