

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 813**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2007 PCT/AT2007/000393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2008 WO08019417**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2007 E 07784622 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2056863**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades oculares**

30 Prioridad:

16.08.2006 AT 13762006

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

04.08.2017

73 Titular/es:

**MARLYN NUTRACEUTICALS, INC. (100.0%)
4404 E. ELWOOD STREET
PHOENIX, AZ 85040, US**

72 Inventor/es:

**AFTAB, AHMED;
DESSER, LUCIA;
LOTZ, BERNHARD y
MOHR, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 628 813 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

Tratamiento de enfermedades oculares

La presente invención se refiere a un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con neoangiogenesis.

5 La angiogenesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la derivación de células endoteliales a partir de vasos pre-existentes. Durante este proceso, las células endoteliales degradan la membrana basal subyacente, proliferan, migran a los tejidos vecinos, y se ensamblan en tubos. Finalmente, se forman las conexiones de tubo a tubo y se establece el flujo de sangre. La capacidad de los tejidos maduros para adaptarse a las demandas cambiantes requiere que tanto factores solubles, tal como factor inducible por hipoxia (HIF) y factor
10 endotelial vascular (VEGF), como también interacciones célula-célula y célula-matriz.

El VEGF fue descrito originalmente como factor causante de la pérdida vascular sustancial y fue nombrado factor de la permeabilidad vascular (VPF). A causa de su efecto mitógeno en células endoteliales, la misma proteína fue renombrada posteriormente factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

15 El VEGF aumenta la permeabilidad del lecho micro-vascular, promoviendo así la filtración de fluido y proteínas de los vasos sanguíneos. Esto se traduce en el desarrollo de edemas, fluido de heridas y seromas (por ejemplo después de cirugía), derrames (por ejemplo, en enfermedades inflamatorias crónicas) y ascitis (por ejemplo en cáncer). El VEGF es 10.000 veces más potente que la histamina en la inducción de la permeabilidad vascular.

Además, el VEGF es uno de los estimuladores de la proliferación de células endoteliales más potentes. Por último, estimula la formación de capilares a partir de las células endoteliales, promoviendo así la cascada de eventos necesarios para la angiogenesis. La neoangiogenesis, el crecimiento de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes en los tejidos recién formados o incluso depósitos (como placas, etc.), contribuye al desarrollo y la progresión de una variedad de afecciones patológicas. En condiciones fisiológicas, la angiogenesis es un proceso estrechamente regulado. En afecciones patológicas, como el cáncer, la artritis reumatoide, endometriosis, psoriasis o neovascularización ocular este proceso esta considerablemente potenciado y es disfuncional.

25 Evidencias crecientes sugieren que los fármacos anti-angiogénicos mejorarán futuras terapias de enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide, la psoriasis y la neovascularización ocular y otras. Experimentos *in vivo* demostraron que la hipoxia (por ejemplo, en regiones próximas a necrosis del tumor) es capaz de inducir la expresión tanto del VEGF como de los receptores de VEGF (VEGFR-1) en diferentes tipos de células. La hipoxia provoca la expresión del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Posteriormente, se acumulan complejos de HIF-1 en el núcleo de la célula, se unen al sitio de unión de HIF-1 del ADN, e inician la respuesta de transcripción regulada al alza del ARNm de VEGF que desencadena un cambio angiogénico que puede provocar que los vasos sanguíneos adyacentes broten hacia el tejido hipóxico. Además, la expresión de VEGF se puede inducir/regular al alza por diversas citoquinas proinflamatorias como se ha demostrado en varios modelos de inflamación crónica como la psoriasis o la artritis reumatoide.

35 El VEGF se puede retirar de la circulación a través de la vía de la alfa 2 macroglobulina (a2M) por la A2M activada por proteasa. El complejo de la a2M-proteasa es capaz de unir VEGF en una cámara en la superficie. El complejo a2M-enzima-VEGF resultante está unido al receptor LRP (receptor de la proteína relacionado con los receptores de lipoproteínas de baja densidad) expresado en la superficie las células como macrófagos y células endoteliales, es fagocitado y destruido. La terapia oral con enzimas proteolíticas aumenta el número de moléculas a2M activadas elevando así la capacidad de la citoquina/factor de crecimiento de destruir los organismos (Desser I et al. Cancer Chemother Pharmacol Suppl (2001) 47: S10-S15; Lauer D et al. Cancer Chemother. Pharmacol Suppl (2001) 47: S4-S9).

45 Recientemente, se han propuesto varios enfoques terapéuticos que utilizan bloqueantes contra el receptor de VEGF o anticuerpos contra VEGF para el tratamiento de enfermedades que implican el aumento de la angiogenesis, principalmente el cáncer, pero también para enfermedades que implican la angiogenesis en el ojo tales como la degeneración macular.

La neovascularización ocular o neoangiogenesis se ha implicado como causa más común de ceguera y es la patología subyacente de aproximadamente 20 enfermedades oculares diferentes. Por ejemplo, en la diabetes, los nuevos capilares formados en la retina invaden el humor vítreo, causando hemorragia y ceguera.

50 El documento WO 2005/110453 se refiere al uso de proteasas MT-SP1 humanas de tipo silvestre y mutadas para escindir VEGF y el receptor de VEGF. Dicha escisión da lugar a una reducción en la angiogenesis y por lo tanto se puede utilizar para tratar patologías asociadas a la angiogenesis.

El documento JP 60112720 A se refiere al uso de papaína y ácido cítrico para tratar enfermedades que no están asociadas a la angiogenesis (por ejemplo, glaucoma).

55 En el documento WO 2004/046199 se describe el uso de sulfato de condroitina para tratar enfermedades de los

ojos.

El documento WO 2005/056784 se refiere al uso de nattoquinasa para tratar la diabetes.

En el documento SU 1342500 se describe el uso de papaína para tratar enfermedades de los ojos, como el glaucoma.

- 5 El documento de Estados Unidos 6103756 se refiere a una composición que comprende antioxidante y flavonoides que se pueden usar para tratar trastornos oculares.

En el documento WO 02 076496 se desvela el uso de un inhibidor de MEK para inhibir el crecimiento tumoral y la angiogénesis.

- 10 En el documento WO 02 08933 se desvela un método para el tratamiento, la prevención o la mejora de una afección angioproliferativa usando un polipéptido con actividad anti-angiogénica.

En el documento WO 99 60984 se desvela el uso de una mezcla de una proteasa de serina y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la inhibición de la angiogénesis en animales.

- 15 El documento WO 2005 100556 se refiere al uso de proteasas de tipo silvestre y mutadas para la escisión de VERGF y los receptores de VERGFR para tratar a pacientes que tienen una patología por VERGF o regulada por VERGFR.

Wobenzym®, que comprende una composición de diversas proteasas, es un producto farmacéutico potencial para prevenir las complicaciones tardías de la diabetes mellitus (Dzivite et al., 2001).

El documento de Estados Unidos 2006 083727 se refiere a una composición con bromelina que se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades de las arterias coronarias.

- 20 Mozaffarieh et al., Nutrition Journal 2003, 2:20 revisa el papel de los carotenoides, la luteína y la zeaxantina en la protección contra la degeneración macular relacionada con la edad.

Un objeto de la presente invención es proporcionar medicamentos para tratar o prevenir enfermedades oculares relacionadas con la neoangiogénesis.

- 25 Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de al menos la proteasa vegetal papaína para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades oculares relacionadas con la neoangiogénesis en la que la enfermedad es degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y en la que el medicamento se administra por vía oral. Sorprendentemente se encontró que en particular, un medicamento que comprende una combinación de proteasa vegetal papaína y al menos una proteasa, que se selecciona del grupo que consiste en proteasas vegetales, animales no mamíferos y microbianas, permite –cuando se administra a un individuo– reducir significativamente (al menos el 40 %, preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 60 %, incluso más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, en particular al menos el 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 lo tanto, la reducción de la angiogénesis. Por lo tanto, para prevenir y/o para el tratamiento de enfermedades oculares relacionadas con la neoangiogénesis en un individuo se pueden usar al menos uno, preferentemente una combinación de al menos dos (al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis) proteasas. La administración de proteasas microbianas, animales no mamíferos y vegetales 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. Una combinación de proteasas incluso como se describe en el presente documento no es tóxica para un animal o ser humano, pero actúa sobre la angiogénesis.
- 30
- 35
- 40

Curiosamente, se pudo demostrar que las proteasas de origen mamífero (es decir, humana y animal) como la tripsina o la quimotripsina no son capaces de inhibir o prevenir la angiogénesis. Por lo tanto no se puede utilizar la administración exclusiva de tales proteasas a un individuo para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con la neoangiogénesis.

- 45 El término "medicamento" tal como se define en el presente documento incluye no solo productos farmacéuticos, sino también suplementos dietéticos.

- 50 Como se usa en el presente documento, "proteasas vegetales" y "proteasas de origen animal" y "proteasa animal no de mamífero" se pretende que sean proteasas de origen natural en plantas o animales no mamíferos y que se extraigan o se obtengan de los mismos. "Proteasas vegetales" y "proteasas de origen animal" y "proteasa animal no de mamífero" 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 clonado en vectores apropiados y expresado en un cultivo celular procariota (por ejemplo, bacteriano) o eucariota (por ejemplo, célula de insecto, célula de mamífero).

"Proteasas microbianas", como se usa en este documento, son proteasas de origen natural en microorganismos, tales como bacterias y hongos (por ejemplo, levaduras, mohos). Sin embargo, dichas proteasas también se pueden aislar a partir 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 de manera recombinante.

5 La al menos una otra proteasa vegetal se selecciona preferentemente del grupo que consiste en bromelaína, ficina y cucumisina.

Las proteasas vegetales preferentemente para ser utilizadas según la presente invención se enumeran anteriormente.

10 Estas proteasas se pueden obtener mediante la expresión recombinante en un huésped o por extracción a partir de una planta que produce naturalmente dichas proteasas, por lo que el propio extracto se puede usar directamente para la fabricación del medicamento de acuerdo con la presente invención. Los métodos de extracción de las proteasas son bien conocidos en la técnica.

15 Por ejemplo, la bromelina se prepara a partir de la porción del tocón o de la raíz de la planta de la piña después de la cosecha de la fruta. Esta porción del tocón o de la raíz se recoge de los campos, se pela y se tritura para extraer el jugo que contiene la enzima bromelina soluble. El procesamiento adicional incluye la precipitación de la enzima para su mayor purificación.

20 La papaína se puede producir como un material en bruto y seco recogiendo el látex de la fruta del árbol de la papaya. El látex se recoge después de realizar una incisión en el cuello de la fruta tras lo cual se puede secar sobre la fruta o gotear en un recipiente. Este látex se seca aún más. Ahora se clasifica como material seco en bruto. Es necesaria una etapa de purificación para eliminar las sustancias contaminantes. Esta purificación consiste en la solubilización y extracción de la enzima papaína activa.

Según una realización preferida de la presente invención, la proteasa microbiana se selecciona del grupo que consiste en nattoquinasa, brinasa, pronasa, seaprosa, serrapeptasa y subtilisina.

25 Las proteasas microbianas también se pueden obtener por técnicas recombinantes o se pueden aislar directamente a partir de cultivos microbianos que comprenden los microorganismos que producen dichas proteasas.

30 La nattoquinasa, por ejemplo, se obtiene del natto, un producto tradicional de la comida japonesa hecho de soja fermentada, o de cultivos que comprenden organismos de una subespecie específica de *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* var. Natto), que son capaces de producir dicha proteasa. El *Bacillus subtilis* var. natto se puede aislar del suelo natural y de natto comercial japonés. La cepa tiene la capacidad para producir una alta actividad de productos de nattoquinasa que degradan la fibrina. Para la producción de nattoquinasa a partir de *B. subtilis* var. natto se tienen que optimizar las fuentes de carbono, fuentes orgánicas de nitrógeno o las fuentes inorgánicas de nitrógeno, las sales minerales, el pH inicial y las temperaturas. Se encontró, por ejemplo, que el tamaño óptimo del inóculo de *B. subtilis* var. natto es de aproximadamente el 5 % (v/v). El medio óptimo puede contener el 2,8 % de proteína de soja, el 1 % de extracto de levadura, y el 0,8 % de maltosa. Además, el pH y la temperatura óptima pueden ser de aproximadamente 6,5 ± 0,5 y aproximadamente 30 °C a 40 °C, respectivamente. El período de incubación óptimo es de 18 a 48 horas. La actividad nattoquinasa en el medio de fermentación puede aumentar por encima de 40 FU/ml.

40 La serrapeptasa, por ejemplo, es una enzima proteolítica aislada a partir de bacterias *Serratia* E15, situados en el intestino de los gusanos de seda. Esta enzima se puede utilizar como suplemento para tratar el dolor y la inflamación de forma natural, y está en uso clínico en partes de Asia y Europa. La serrapeptasa se utiliza como una alternativa a los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) que se usan comúnmente para tratar la artritis y la inflamación.

La proteasa animal no de mamífero se selecciona preferentemente del grupo que consiste en reptilasa, enzima de krill, batroxobina y lumbroquinasa.

45 Estas proteasas se pueden producir de manera recombinante por métodos conocidos en la técnica o se pueden obtener directamente de los respectivos animales.

50 Los medicamentos particularmente preferidos comprenden bromelina y papaína como proteasas vegetales y opcionalmente nattoquinasa como proteasa microbiana. Las relaciones preferidas entre estas proteasas en un medicamento de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en la siguiente tabla, por lo que la cantidad de nattoquinasa y/o bromelaína puede variar, independientemente entre sí, entre el 0 y el 80 %, preferentemente del 10 al 75 %, más preferentemente del 15 (o 16,67) al 75 % de la cantidad total de proteasa presente en el medicamento.

Bromelina	Nattoquinasa	Papaína
16,67 %	16,67 %	66,67 %
25,00 %	25,00 %	50,00 %
0,00 %	75,00 %	25,00 %
75,00 %	0,00 %	25,00 %
25,00 %	0,00 %	75,00 %
16,67 %	66,67 %	16,67 %
50,00 %	0,00 %	50,00 %
0,00 %	50,00 %	50,00 %
0,00 %	25,00 %	75,00 %
33,33 %	33,33 %	33,33 %
50,00 %	25,00 %	25,00 %

Según otra realización preferida de la presente invención la papaína está comprendida en el medicamento en una cantidad del 10 al 90 % en p/p, preferentemente del 20 al 80 % en p/p, más preferentemente del 30 al 70 % en p/p.

- 5 La papaína se administra preferentemente a un individuo en una cantidad de 1 a 100 mg/kg, preferentemente de 2 a 50 mg/kg, más preferentemente 5 a 20 mg/kg de peso corporal.

El medicamento preferentemente puede comprender 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.

- 10 Dependiendo de la formulación farmacéutica del medicamento según la presente invención se pueden utilizar otras sustancias diversas como excipientes, recubrimientos, etc.

Además, 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 comprimidos gastroresistentes y cápsulas gastroresistentes.

- 15 La administración oral no es invasiva y por lo tanto permite una administración repetida (sin dañar el paciente) del medicamento.

El medicamento de la presente invención se puede formular especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellos adaptados para la siguiente administración oral, por ejemplo comprimidos.

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

- 25 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 de sodio, 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 libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de 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 según la presente invención. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen:

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

- 10 Las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para la administración oral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped a tratar y el modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación unitaria generalmente será aquella cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico.

- 15 Métodos de preparación de 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 ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto. Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas o comprimidos cada uno que contiene una cantidad predeterminada de una combinación de proteasa de la presente invención como ingredientes activos.

- 20 Las proteasas de la presente invención también se pueden administrar como bolo. En formas de dosificación sólidas de la invención para administración oral (cápsulas o comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente 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 extensores, 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 alginico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de 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) agentes colorantes.

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

- 35 Un comprimido se puede fabricar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa celulosa sódica reticulada), agente de superficie activa o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente se pueden marcar o preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en materia de formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente 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 forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones opcionalmente también pueden contener agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente(s) activo(s) sólo, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal u, opcionalmente, de manera retardada. Los 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.

- 60 El medicamento de la presente invención se administra por vía oral a seres humanos y otros animales para terapia. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención

se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad de la proteasa particular de la presente invención empleada, la vía de administración empleada, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las proteasas empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario que tiene experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con una dosis de las proteasas de la invención empleadas en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

Si bien es posible que las proteasas de la presente invención se administren solo, es preferible administrar las proteasas como formulación farmacéutica (composición).

Según otra realización preferida de la presente invención, el medicamento comprende además al menos un ingrediente activo adicional.

Dicho ingrediente activo puede ser cualquiera que pueda apoyar la prevención y el tratamiento de enfermedades angiogénicas con las proteasas según la presente invención. Sin embargo, por supuesto también es posible agregar ingredientes activos que presentan efectos distintos de dichas proteasas.

El al menos un ingrediente activo adicional se selecciona preferentemente del grupo que consiste en flavonoides, en particular bioflavonoides, antioxidantes u otras sustancias como extracto de corteza de sauce blanco.

Según otra realización preferida de la presente invención, el medicamento comprende al menos una (dos, tres o incluso cuatro) proteasas seleccionadas del grupo que consiste en bromelina, papaína, ficina, nattoquinasa, brinasa, pronasa, serrapeptasa, reptilasa, enzima de krill, batroxobina, lumbroquinasa, cucumisina, subtilisina, seaprosa y opcionalmente un ingrediente activo adicional, en el que dicho ingrediente activo adicional preferentemente es un flavonoide, en particular, la rutina.

Según una realización preferida de la presente invención, el flavonoide se selecciona del grupo que consiste en rutina o sus derivados.

La bromelina y la papaína, por ejemplo, se denominan tiol proteasas y contienen un resto de cisteína en el sitio activo. En condiciones oxidantes el grupo tiol de esta cisteína pierde un átomo de hidrógeno y se puede reticular con otro grupo tiol, formando un puente disulfuro o, como alternativa, la reticulación con otro resto por el mismo proceso oxidativo. En este estado oxidado, la bromelina y la papaína pierden actividad. A través de la inclusión de la vitamina C, bioflavonoides como la rutina y proantocianidinas antioxidantes puede prevenirse la oxidación del grupo sulfhidrilo activo de las tiol proteasas.

Dicho ingrediente activo adicional preferentemente está comprendido en el medicamento de la presente invención en una cantidad del 5 al 35 % en p/p, preferentemente del 10 al 30 % en p/p, más preferentemente del 15 al 25 % en p/p.

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

Figura 1 muestra la liberación de LDH en el sobrenadante de HUVEC tratadas con enzima (ensayos de toxicidad).

Figura 2 muestra un ensayo con MTT con HUVEC tratadas con enzima (actividad antiproliferativa).

Figura 3 (A) muestra la inhibición de la formación de tubos inducida por VEGF por combinación del 25 % de bromelina, 50 % de nattoquinasa y 25 % de papaína.

La Figura 3 (B) muestra el control tratado solo con VEGF. Mientras que en el control de VEGF es visible un patrón estrecho de tubos formados, la muestra tratada con enzima presenta amplias áreas de ausencia de formación de tubos que indica actividad antiangiogénica de la mezcla de enzimas.

La Figura 4 muestra las concentraciones de VEGF en sangre de los pacientes tratados con Rutozym.

La Figura 5 muestra un ensayo con MTT con HUVEC estimuladas con VEGF y Rutosid. No se puede observar inhibición de la proliferación.

La Figura 6 muestra los efectos tóxicos de Rutosid en HUVEC. No se pueden observar efectos tóxicos HUVEC quiescentes, mientras que las HUVEC activadas con VEGF muestran un ligero efecto.

La Figura 7(izquierda) muestra la inhibición de la formación espontánea de tubos en HUVEC. La bromelina, ficina, nattoquinasa, papaína y serrapeptasa, pero no la quimotripsina o la tripsina inhibieron la formación de tubos.

La Figura 7(derecha) muestra la inhibición de la formación de tubos inducida por VEGF en HUVEC. La bromelina, ficina, nattoquinasa, papaína y serrapeptasa, pero no la quimotripsina o tripsina inhibieron la formación de tubos casi en la misma medida que en HUVEC no tratadas.

Ejemplos:Materiales:

- 5 Se obtuvo bromelina de tallo de piña con una actividad de 3,51 U/mg de Sigma Aldrich, Austria
 Se adquirió nattoquinasa con una actividad de 10.000 U/ml de Japan Bio Science Laboratory Co, Ltd.
 Se obtuvo papaína de Carica Papaya con una actividad de > 3U/mg de Sigma Aldrich, Austria

Ejemplo 1: Ensayo de toxicidad

10 Se evaluó la actividad antiproliferativa de la bromelina, la nattoquinasa y la papaína mediante un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). Se recogieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) de cultivos semiconfluentes por tratamiento con tripsina, sembradas a una densidad de 2500 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos, previamente recubiertas con fibronectina humana. A fin de permitir una fijación apropiada, las células se incubaron durante 24 horas en medio basal endotelial 2MV (Cambrex Biochemicals) que contiene el 10 % de suero fetal bovino, 60 µg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, ácido ascórbico y heparina. Después de la unión, las células se dejaron morir de inanición por incubación a 37 °C/95 % de humedad en Medio 199 + 10 % de suero fetal bovino (FCS) y sin factores de crecimiento. Después de 24 horas, el sobrenadante se reemplazó por Medio 199 que contiene el 10 % de FCS, 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): 50 µl de alícuotas de todos los pocillos se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano fresca (ensayo enzimático). Se añadió tampón de ensayo 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. En menos 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. Demuestran claramente que la bromelina, la nattoquinasa y la papaína hasta un nivel de la inclusión de 25 µg/ml no mostraron efectos tóxicos en HUVEC después de 2 días de incubación.

Ejemplo 2: Actividad antiproliferativa

30 La actividad antiproliferativa de la bromelina, nattoquinasa y papaína y sus mezclas se evaluó mediante un ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se recogieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) a partir de cultivos semi-confluentes por tratamiento con tripsina sembradas 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 incuban durante 24 horas en medio basal endotelial 2MV (Cambrex Biochemicals) que contiene el 10 % suero fetal bovino, 60 µg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, ácido ascórbico y heparina. Después de la unión, las células se dejan morir de inanición por incubación a 37 °C/95 % de humedad en Medio 199 + 10 % de suero fetal bovino (FCS) y sin factores de crecimiento. Después de 24 horas, el sobrenadante se reemplazó por Medio 199 que contiene el 10 % de FCS y diferentes concentraciones de bromelina, nattoquinasa y papaína. Las células se incubaron otras 48 horas a 37 °C/95 % de humedad. El ensayo con MTT se llevó a cabo utilizando 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 proliferación con el 100 % que es la proliferación del control tratado con VEGF.

40 Los resultados de los experimentos de concentración-respuesta se muestran en la Figura 2. Demuestran un efecto antiproliferativo claro de la bromelina, la nattoquinasa y la papaína con la bromelina y la papaína que alcanzan el crecimiento del 75 % a concentraciones tan bajas como 25 µg/ml. Tomados en conjunto con los resultados del ensayo de liberación de LDH, estos datos apuntan a una actividad antiproliferativa clara, pero no citotóxica.

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

45 Tabla 1: Inhibición del crecimiento de HUVEC de combinaciones de bromelina, nattoquinasa y papaína en presencia de VEGF.

Bromelina	Nattoquinasa	Papaína	% de 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 3: Actividad antiangiogénica

Métodos: Se evaluó la actividad antiangiogénica mediante un ensayo de formación de tubo. El factor de crecimiento Matrigel reducido (Becton Dickinson, Viena) se descongeló a una temperatura de 4 °C. Se pipetearon 50 µl por pocillo en los pocillos de una placa de microtitulación 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. Se cosecharon HUVEC mediante tratamiento con tripsina y se sembraron en microplacas de 96 pocillos recubiertas de Matrigel a una densidad de 20.000 células por pocillo en medio de crecimiento endotelial 2 (MV) (Lonza, Bruselas) suplementado con ácido ascórbico e hidrocortisona de acuerdo con las instrucciones del fabricante así como 5000 U/ml de heparina y el 1 % de suero fetal bovino. Los fármacos y el VEGF se añadieron a las concentraciones deseadas. Después de otras 16 a 18 h, se fotografiaron los pocillos. La longitud total de los tubos se determinó utilizando el Software ImageJ, medido por el Plugin Neuron Length Determination.

Resultados

Los resultados de los ensayos de formación de tubo de enzimas y mezclas de enzimas se muestran en la fig. 3, fig. 7 y la Tabla 1.

La Tabla 1 muestra la inhibición de la formación de tubos por diversas mezclas de bromelina, nattoquinasa y papaína. Los resultados indican claramente

1. La formación del tubo es inhibida por las enzimas bromelina, ficina, nattoquinasa, papaína y serrapeptasa.
2. La combinación de bromelina, nattoquinasa y papaína tiene un mayor efecto que estos fármacos solos.

Bromelina	Nattoquinasa	Papaína	% de formación de tubos
75,00 %	25,00 %	0,00 %	1,89 %
16,67 %	16,67 %	66,67 %	6,48 %
25,00 %	25,00 %	50,00 %	12,25 %
0,00 %	75,00 %	25,00 %	12,58 %
75,00 %	0,00 %	25,00 %	13,66 %
25,00 %	0,00 %	75,00 %	16,23 %
16,67 %	66,67 %	16,67 %	16,35 %
0,00 %	0,00 %	0,00 %	16,60 %
50,00 %	0,00 %	50,00 %	17,27 %
0,00 %	50,00 %	50,00 %	19,99 %
0,00 %	25,00 %	75,00 %	21,74 %
33,33 %	33,33 %	33,33 %	25,86 %
25,00 %	75,00 %	0,00 %	38,43 %
0,00 %	0,00 %	0,00 %	40,64 %
50,00 %	25,00 %	25,00 %	52,22 %
0,00 %	0,00 %	100,00 %	60,14 %
0,00 %	0,00 %	0,00 %	100 %

Tabla 1: Formación de tubos (% de controles) en HUVEC en presencia de VEGF. Los resultados se muestran como % de formación de tubos con el 100 % que equivale a la formación de tubos en las muestras tratadas solo con VEGF. Combinaciones no presentadas no inhibieron la formación de tubos.

Conclusiones

Se detectó una disminución significativa en la formación mediada por VEGF de tubos de tipo microvasos después del tratamiento con bromelina, ficina, nattoquinasa, papaína o serrapeptasa solas, y después del tratamiento con una mezcla de las enzimas bromelina, nattoquinasa y papaína.

Ejemplo 4:

En este ejemplo se estudió el efecto de una terapia con enzima (mezcla de enzimas: se estudió, bromelina, papaína + rutina bioflavonoide, extracto de corteza de sauce blanco) sobre la cantidad de concentración de VEGF en la sangre. Se pudo demostrar (véase resultados a continuación), que la terapia de la enzima reduce significativamente la concentración elevada de VEGF en sangre humana.

Se realizó un ensayo clínico como estudio piloto multicéntrico aleatorio abierto, sobre 111 pacientes diabéticos de tipo 2 de ambos sexos en dos grupos paralelos y comparables. 54 pacientes recibieron una mezcla de enzimas (nattoquinasa (20 000 FU/gm), 25 mg de bromelina (2450 GDU/gm), 90 mg de papaína NF (2400 unidades USP/mg). 100 mg de complejo de bioflavonoides de rutina (rutósidos y rutinósidos), 120 mg extracto de corteza de sauce blanco (15 % de salicina/7 % de polifenoles) 100 mg de Marlyn Nutraceuticals, EE. UU.) durante 4 semanas. Las concentraciones de VEGF en el plasma de los pacientes se analizaron 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 sangre se separaron en 4 grupos diferentes (cuartiles; véase Figura 4): Concentración de VEGF en sangre de pacientes antes de terapia < 50 ng/ml; (s50 = inicio <50 ng/ml; e50 = final) s100: concentración de VEGF <100 ng/ml antes de terapia; s200: <200 ng/ml antes de terapia y s300:> 200 ng de VEGF antes de terapia. Se pudo demostrar que se puede utilizar un medicamento de acuerdo con la presente invención que comprende proteasas de fuentes vegetales y/o microbianas para reducir el nivel de VEGF en sangre y, por lo tanto, se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la neoangiogénesis.

Ejemplo 5: Efectos antiproliferativos de Rutosid sobre HUVEC

Para evaluar una posible actividad antiproliferativa de Rutosid se utilizó un ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se recogieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) a partir de cultivos semi-confluentes por tratamiento con tripsina sembradas 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 fetal bovino al 10 %, 60 µg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial, hrEGF, hrFGF-2, hrIGF, hrVEGF, ácido ascórbico y heparina. Después de la unión, las células se dejaron morir de inanición por incubación a 37 °C/95 % de humedad en Medio 199 + 10 % de suero fetal bovino (FCS) y sin factores de crecimiento. Después de 24 horas, el sobrenadante se reemplazó por Medio 199 que contiene el 10 % de FCS y diferentes concentraciones de Rutosid y VEGF. Las células se incubaron otras 48 horas a 37 °C/95 % de humedad. El ensayo con MTT se llevó a cabo utilizando un Kit EZ4U MTT (Biomedica, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Se midió la densidad óptica a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. Los resultados se expresan como % de proliferación que es el 100 % de la proliferación del control tratado con VEGF.

Los resultados indican claramente que rutosid no inhibe la proliferación estimulada por VEGF de HUVEC (véase Fig. 5).

Ejemplo 6: Efectos tóxicos de Rutosid en HUVEC

Para analizar una posible actividad citotóxica de rutosid se utilizó un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) a partir de cultivos semi-confluentes se recogieron por tratamiento con tripsina, sembradas a una densidad de 2500 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos, previamente recubiertas con fibronectina humana. A fin de permitir la fijación apropiada, las células se incubaron durante 24 horas en medio basal endotelial 2MV (Cambrex Biochemicals) que contienen suero fetal bovino al 10 %, 60 µg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial, hrEGF, hrFGF-2, hrIGF, hrVEGF, ácido ascórbico y heparina. Después de la unión, las células se dejaron morir de inanición por incubación a 37 °C/95 % de humedad en Medio 199 + 10 % de suero fetal bovino (FCS) y sin factores de crecimiento. Después de 24 horas, el sobrenadante se reemplazó por Medio 199 que contiene el 10 % de FCS, 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): se transfirieron alícuotas de 50 µl de todos los pocillos a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano (ensayo enzimático). Se añadió tampón de ensayo 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. En menos 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 indican claramente que la toxicidad de rutosid es insignificante en HUVEC (ver Fig. 6).

Ejemplo 7: Inhibición de VEGF en los modelos de ratón de retinopatía inducida por oxígeno y neovascularización coroidea inducida por láser por proteasas vegetales

La retinopatía angioproliferativa es una de las principales causas para la pérdida severa de visión en los países industrializados. Las enfermedades subyacentes son la diabetes, la oclusión de la vena retiniana, retinopatía del prematuro o las últimas etapas de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). La terapia convencional para la enfermedad isquémica de la retina se basa en la destrucción del tejido de la retina periférica para reducir al mínimo la producción de factores angiogénicos, como el VEGF. Dado que la destrucción del tejido neuronal es irreversible, sería deseable un tratamiento local con inhibidores de factores angiogénicos para proteger a los pacientes que tienen un mayor riesgo de desarrollar neovascularización retiniana o coroidea. En AMD, el tratamiento local con fármacos angiointerceptores se ha convertido entretanto en el tratamiento de cuidado convencional.

Métodos

A. Retinopatía inducida por oxígeno (OIR)

Se estableció un modelo de ratón de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) como se describe por Smith y colegas Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35: 101-111). Ratones de 7 días (P7) de edad C57/B16J se pusieron en 75 % de oxígeno hasta P12. Después del retorno a oxígeno normal, los animales desarrollaron neovascularización retiniana debido a la hipoxia relativa. Este efecto estuvo influido por una sustancia de ensayo inyectada por vía intravítrea en un ojo mientras que en el otro ojo se inyectó una solución de control. La proliferación retiniana se evaluó a P17 por monturas enteras después de la perfusión con dextranofluoresceína. Estas monturas enteras permiten evaluar los cambios vasculares en la vasculatura de la retina de manera codificada. Se determinaron puntuaciones de acuerdo con un sistema de puntuación para cada montura plana y se comparan por el ensayo por pares coincidentes de rangos firmados de Wilcoxon que resulta en una diferencia significativa entre el tratamiento y el control. Se utilizaron un total de 30 ratones por grupo.

En un segundo ensayo se inyectó la sustancia de ensayo IP a P12. En este caso, no era posible una comparación intra-individual entre los dos ojos y, por lo tanto, era necesario un grupo de control adicional. Se utilizaron un total de 25 ratones por grupo.

B. Neovascularización coroidea inducida por láser (CNV por láser)

Se estableció un modelo de ratón para la neovascularización coroidea inducida por láser como se describe por Campochiaro y colegas (Tobe et al, Am. J. Pathol. (1998) 153: 1641-1646. Se anestesiaron ratones C57/B16J no menores de 12 semanas, y se indujo neovascularización con 3 quemaduras con láser controladas visualmente en la retina el día 0 (d0). Los animales desarrollaron neovascularización coroidea en los sitios de láser en las dos semanas siguientes a la lesión. A d7 o varios días después, se inyectó una sustancia de ensayo por vía intravítrea en un solo ojo y una solución de control en el otro ojo para ver si había una influencia en la angiogénesis de la retina o la coroides. 13 días más tarde, a d14, los animales fueron perfundidos con dextranofluoresceína, y se prepararon monturas coroides enteras. Las monturas enteras permiten evaluar los cambios vasculares del coroides y el tamaño de la membrana de CNV. Los valores para cada punto de láser se compararon mediante el ensayo por pares coincidentes de rangos firmados de Wilcoxon que resulta en una diferencia significativa entre el tratamiento y el control. Se utilizaron un total de 30 ratones por grupo.

En un experimento adicional se inyectó la sustancia de ensayo IP a P7 o a varios días. En este caso, no era posible una comparación intra-individual entre los dos ojos y, por lo tanto, y era necesario un grupo de control adicional. Se utilizaron un total de 25 ratones por grupo.

REIVINDICACIONES

1. Medicamento que comprende la proteasa vegetal papaína para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares relacionadas con la neoangiogénesis, en el que la enfermedad es la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y en el que el medicamento se administra por vía oral.
- 5 2. Medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medicamento comprende además al menos una proteasa seleccionada del grupo que consiste en proteasas vegetales, animales no de mamíferos y microbianas.
3. Medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la al menos una proteasa vegetal se selecciona del grupo que consiste en bromelina, ficina y cucumisina.
- 10 4. Medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la proteasa microbiana se selecciona del grupo que consiste en nattoquinasa, pronasa, brinasa, seaprosa, serrapeptasa y subtilisina.
5. Medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la proteasa animal no de mamífero se selecciona del grupo que consiste en reptilasa, enzima de krill, batroxobina y lumbroquinasa.
- 15 6. Medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la papaína está comprendida en el medicamento en una cantidad del 10 al 90 % en p/p, preferentemente del 20 al 80 % en p/p, más preferentemente del 30 al 70 % en p/p.
7. Medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la papaína se administra a un individuo en una cantidad de 1 a 100 mg/kg, preferentemente de 2 a 50 mg/kg, más preferentemente de 5 a 20 mg/kg de peso corporal.
- 20 8. Medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el medicamento 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.
9. Medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el medicamento se proporciona en una forma farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en comprimidos gastrorresistentes y cápsulas gastrorresistentes.
- 25 10. Medicamento para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el medicamento comprende además al menos un ingrediente activo adicional.
11. Medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** el al menos un ingrediente activo adicional es un flavonoide y/o un antioxidante.
- 30 12. Medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** el flavonoide es rutina.
13. Medicamento para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado porque** el ingrediente activo adicional está comprendido en el medicamento en una cantidad del 5 al 35 % en p/p, preferentemente del 10 al 30 % en p/p, más preferentemente del 15 al 25 % en p/p.
- 35 14. Medicamento para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** el medicamento comprende papaína y al menos una proteasa seleccionada del grupo que consiste en bromelina, ficina, nattoquinasa, brinasa, pronasa, serrapeptasa, reptilasa, enzima de krill, batroxobina, lumbroquinasa, cucumisina, subtilisina, seaprosa y opcionalmente un ingrediente activo adicional, en el que dicho ingrediente activo adicional preferentemente es un flavonoide, en particular, rutina.

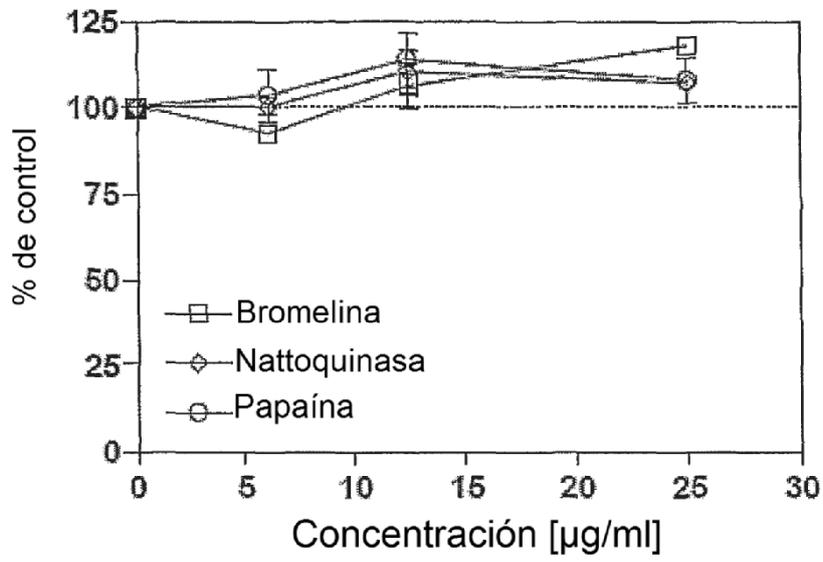


Fig. 1

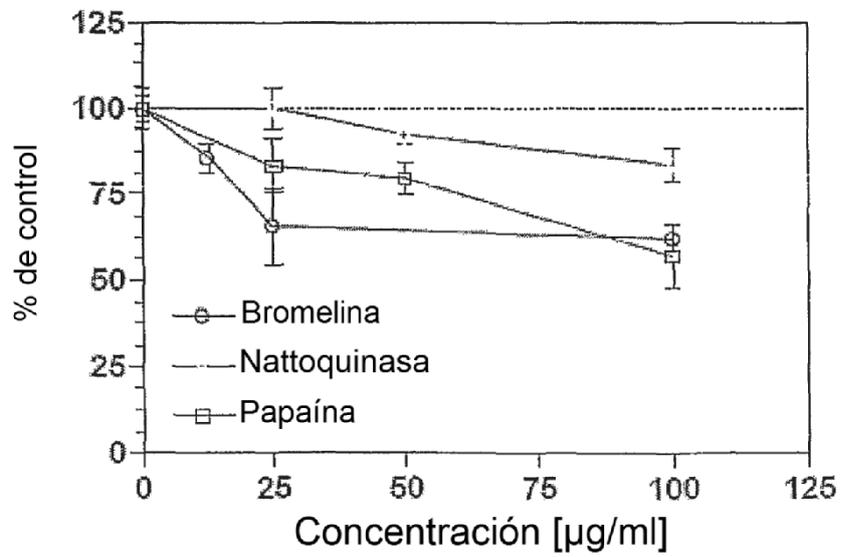


Fig. 2

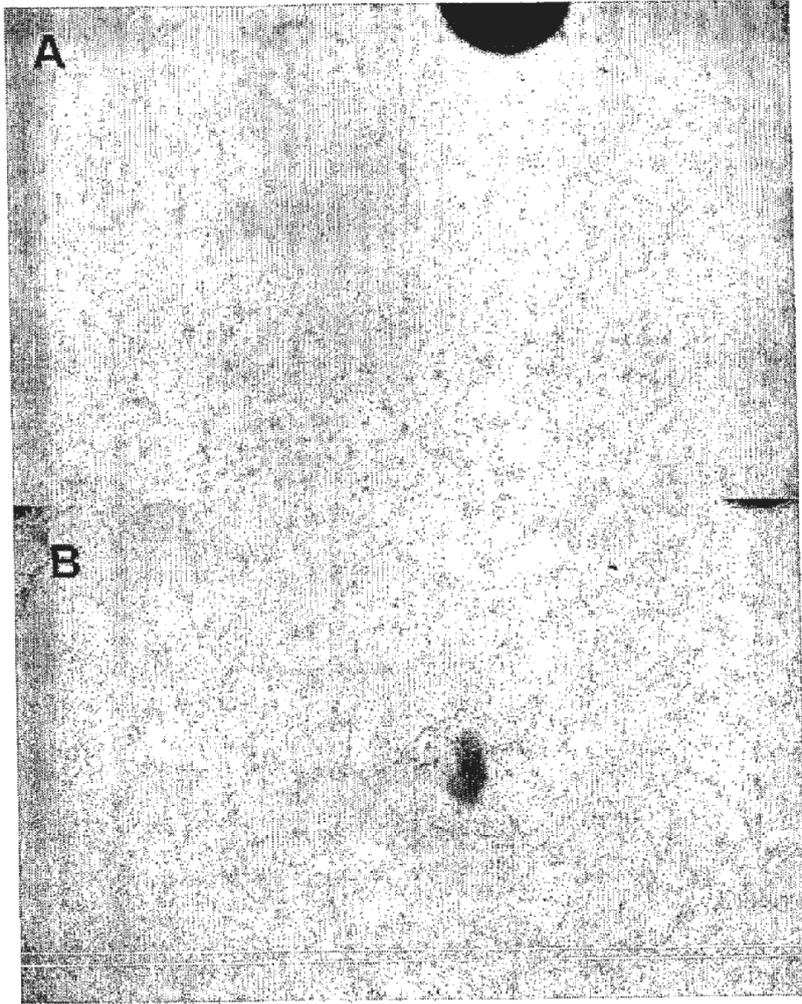


Fig. 3

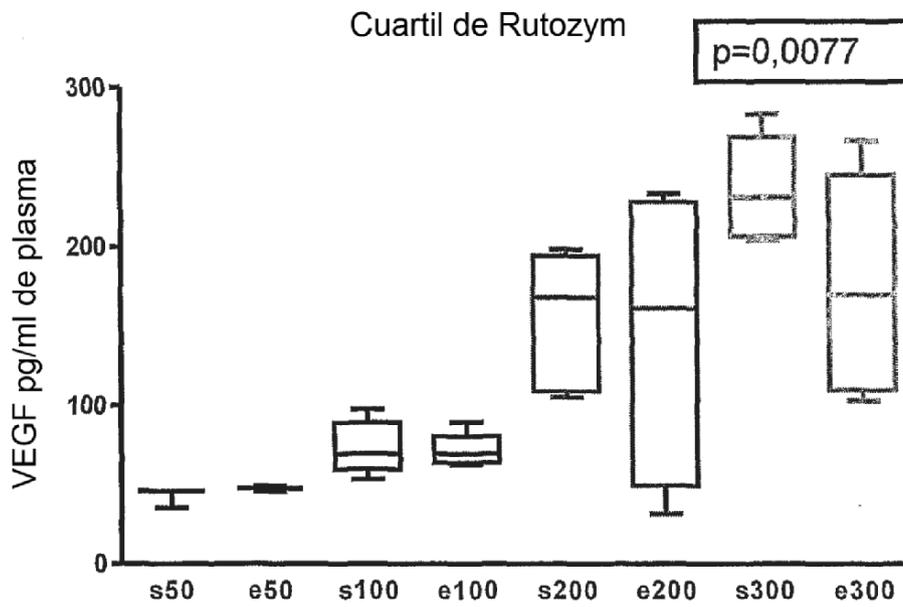


Fig. 4

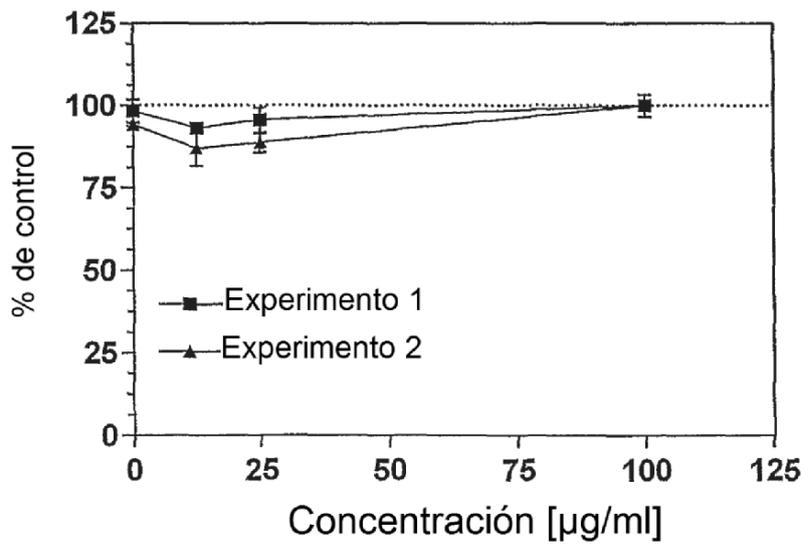


Fig. 5

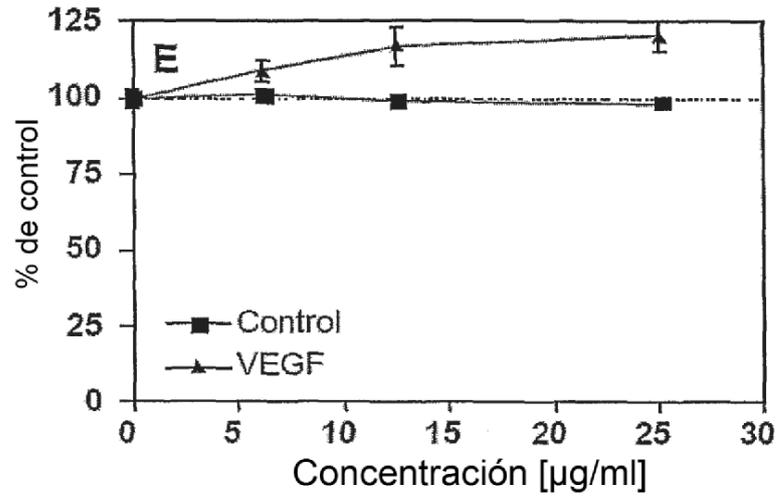


Fig. 6

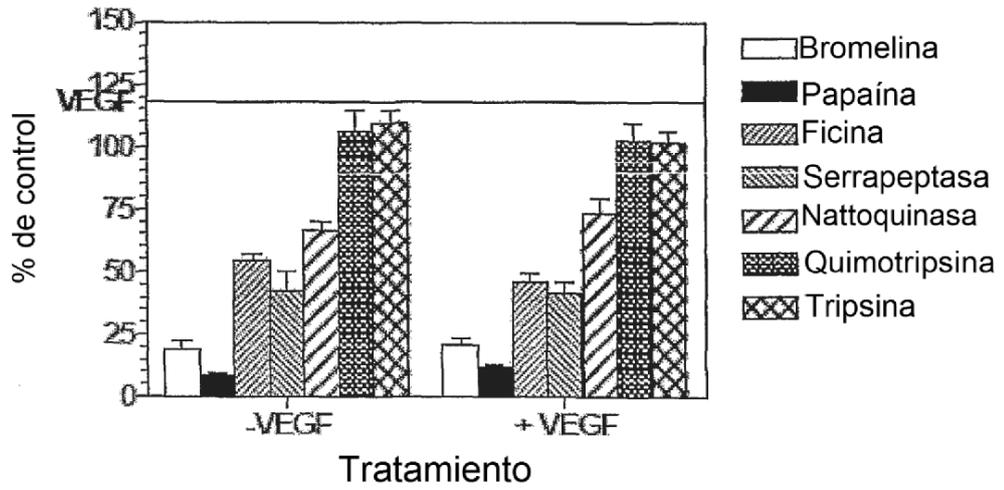


Fig. 7