

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 847**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2013 PCT/EP2013/073160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14079689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2013 E 13794831 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2922567**

54 Título: **Composiciones fibrinolíticas que comprenden bromelina y nattoquinasa para la prevención y el tratamiento de estados flebotrombóticos**

30 Prioridad:

23.11.2012 IT MI20121997

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

17.10.2017

73 Titular/es:

VELLEJA RESEARCH SRL (50.0%)

Via Natta, 28

29010 Pontenure (PC), IT y

GNOSIS S.P.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

DI PIERRO, FRANCESCO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 637 847 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

Composiciones fibrinolíticas que comprenden bromelina y nattoquinasa para la prevención y el tratamiento de estados flebotrombóticos

5 La presente invención se refiere a composiciones fibrinolíticas para la prevención y el tratamiento de estados flebotrombóticos.

Antecedentes de la invención

La flebotrombosis es una enfermedad caracterizada por la formación de trombos en la luz de una o más venas, con causas no inflamatorias, a diferencia de la flebitis.

10 Varias causas pueden provocar la enfermedad, y pueden producirse individualmente o combinadas de diversas maneras: modificaciones de la pared venosa, flujo sanguíneo lento, o cambios en la coagulabilidad sanguínea. Estos fenómenos son más frecuentes en personas con un estado de salud general precario, en pacientes diabéticos, pacientes cardiopáticos y pacientes convalecientes posquirúrgicos.

15 Con mayor frecuencia, las extremidades inferiores están afectadas, así como las venas pélvicas, la vena porta y los senos de la duramadre. Los trombos que se forman se adhieren débilmente a la pared del vaso, desprendiéndose fácilmente de este modo y convirtiéndose en émbolos, que son capaces de ocluir otros vasos distales.

20 El trombo puede ocluir el vaso, deteniendo completamente el flujo sanguíneo. El vaso es posteriormente invadido por tejido conectivo, transformando el vaso en una masa fibrosa. Pueden formarse vasos sanguíneos pequeños nuevos, permitiendo el restablecimiento total o parcial del flujo sanguíneo. Los trastornos relacionados con la flebotrombosis, y el cuadro clínico derivado, difieren según la localización y la importancia del vaso implicado; cuanto mayor sea el área, más evidentes son los efectos que derivan de la circulación alterada: turgencia del lecho de corriente venoso vascular, edema del tejido circundante, color azulado y dolor más o menos agudo. Si el vaso es pequeño, la flebotrombosis puede ser asintomática y puede curarse, mientras que en otros casos pueden presentarse complicaciones, siendo la más grave la embolia pulmonar.

25 El tratamiento de la flebotrombosis implica la inmovilización de la extremidad. También está indicado el uso de fármacos trombolíticos.

La bromelina es una mezcla de cisteína y proteasa extraída del fruto y el tallo de la piña (*Ananas comosus*), que pertenece a la familia de plantas *Bromeliaceae*. La masa molecular de los componentes varía de 8 a 28,5 kDa.

La concentración de bromelina se expresa en unidades proteolíticas (unidades GDU o unidades internacionales, IU) o unidades de peso. La bromelina se usa principalmente como agente antiinflamatorio y antiinflamatorio.

30 Es particularmente eficaz en estados inflamatorios de los tejidos blandos, incluso tras episodios traumáticos y reacciones tisulares posquirúrgicas. Se ha demostrado que la actividad antiinflamatoria de la bromelina se debe a su capacidad de aumentar la biosíntesis de prostaglandinas antiinflamatorias (es decir, prostaglandinas E2) e inhibir las prostaglandinas proinflamatorias.

35 En su uso antiinflamatorio, la bromelina se administra en dosis repetidas de 40 mg de dos a seis veces al día, aunque se han probado dosis mucho más altas sin ningún efecto secundario importante, con la única excepción de trastornos gastrointestinales leves y reacciones de hipersensibilidad raras. Otras actividades farmacológicas de bromelina incluyen acciones antitrombóticas y profibrinolíticas, una actividad hipotensora y la capacidad de solubilizar las placas ateroscleróticas. También se han descrito las actividades sinérgicas en terapias antibióticas y antitumorales. La bromelina también se usa en la dispepsia, combinada con los jugos pancreáticos.

40 La nattoquinasa es una enzima proteolítica extraída de natto, un alimento japonés tradicional basado en habas de soja herbidas fermentadas por una *Bacillus subtilis* particular: *B. subtilis natto*.

La nattoquinasa es una serina-proteasa de aproximadamente 30 kDa, que pertenece a la familia de la subtilisina, con una potente actividad fibrinolítica. Por este motivo se emplea como un sustituto para otros fármacos antiagregantes y anticoagulantes tales como ácido acetilsalicílico, ticlopidina y warfarina.

45 El documento WO 200821987 desvela una preparación que contiene diversas enzimas (una proteasa fúngica, papaína, bromelina, pancreatina fúngica, amilasa, nattoquinasa, proteasa-S y lipasa) combinadas con derivados herbarios (rutina y jengibre) y oligoelementos (calcio, magnesio, potasio y otros elementos) para la prevención y el tratamiento de la tromboflebitis.

50 El objeto de la presente invención es una combinación de dos enzimas solo, a saber, bromelina y nattoquinasa, en relaciones específicas y formuladas adecuadamente, que presentan un efecto sinérgico particularmente ventajoso.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a composiciones fibrinolíticas para la prevención y el tratamiento de estados flebotrombóticos, que contienen bromelina y nattoquinasa como los únicos principios activos en la relación de peso de 1,6:1, y el uso combinado de bromelina y nattoquinasa en la misma relación en peso en vista de sus propiedades fibrinolíticas.

Según un aspecto preferido, las composiciones según la invención contendrán los principios activos dentro de los siguientes intervalos:

a) bromelina: entre 20 y 400 mg, preferentemente 160 mg/dosis/día; y

b) nattoquinasa: usada en dosis de entre 10 y 100 mg.

Según un aspecto más preferido, las composiciones según la invención contendrán los principios activos en las siguientes dosis:

c) bromelina: 160 mg/dosis/día; y

d) nattoquinasa: 100 mg/dosis/día.

Según un aspecto preferido, las composiciones según la invención se formularán como comprimidos bicapa, con una enzima por capa.

Ensayo clínico

Las pruebas de la eficacia trombolítica de preparaciones de bromelina y nattoquinasa se llevaron a cabo según el modelo de Astrupt ("The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity". Arch. Biochem. Biophys.; 40:346-351, 1952), realizando cada prueba por triplicado sobre fibrina bovina en presencia de 24 unidades de plasminógeno, verificando la acción fibrinolítica de la bromelina y la nattoquinasa individualmente, y mezclando las dos sustancias en diversas relaciones en peso. En el modelo descrito anteriormente, la acción de bromelina fue de $11,5 \pm 2,5$ FU/ml, mientras que la de la nattoquinasa fue de $18,9 \pm 3,3$ FU/ml. Cuando las dos enzimas se mezclaron entre sí en la relación de 1:1, la acción fibrinolítica fue de $97,8 \pm 13,3$ FU/ml, con un efecto sinérgico claro, que se confirmó reduciendo las dosis de ambas enzimas en 1/10 y probando de nuevo la acción fibrinolítica de los dos compuestos en una mezcla 1:1 en peso. Operando de esta manera, la acción fibrinolítica fue de $12,7 \pm 2,9$ FU/ml, un valor similar al que puede obtenerse usando ambas enzimas en dosis 10 veces más altas.

Cuando se realizaron pruebas adicionales, se observó que los mejores resultados se obtuvieron mezclando bromelina y nattoquinasa en la relación en peso de 1,6:1.

La eficacia de la combinación de bromelina y nattoquinasa también se evaluó mediante comparación con la combinación de enzimas proteolíticas y otros ingredientes descritos en el documento WO 2008/02198, usando de nuevo el modelo de Astrupt. Por lo tanto, se evaluó la acción fibrinolítica de los compuestos individuales, la mezcla total y la mezcla de solo enzimas individuales, es decir, sin los derivados herbarios. Se observó que, individualmente, la mayoría de los compuestos (proteasa fúngica, papaína, pancreatina, amilasa y proteasa-S) fueron mucho menos activos que la bromelina y la nattoquinasa. Los dos últimos, que fueron activos en valores de $125 \pm 13,2$ FU/ml and $139,5 \pm 34,7$ FU/ml respectivamente, resultaron no menos de 100 veces más activo que las otras enzimas únicas. Sin embargo, los derivados herbarios y los oligolementos resultaron totalmente inactivos. La mezcla de todos los ingredientes (enzimas, derivados herbarios y oligolementos) condujo a actividad fibrinolítica, pero menos que la obtenida mediante la mezcla de bromelina y nattoquinasa sola. La acción fibrinolítica de la mezcla total fue de $47,9 \pm 11,8$ FU/ml, la de la mezcla de todas las enzimas de $52,7 \pm 8,4$ FU/ml, y la de la combinación de la bromelina y la nattoquinasa de $1.127,67 \pm 119,6$ FU/ml. Estas pruebas demuestran claramente que la combinación de bromelina y nattoquinasa es más eficaz que la combinación reivindicada en el documento WO200821987 y la combinación de las enzimas únicas descritas en el presente documento. Este fenómeno puede asociarse con posibles antagonismos creados mezclando diferentes estructuras de proteína, y estructuras de proteína con moléculas de derivación herbaria, que compiten por los mismos epítomos moleculares en fibrina, haciendo que el procedimiento fibrinolítico sea ineficaz o no muy eficaz.

Formulaciones

Las composiciones según la invención pueden formularse de una manera adecuada para la administración oral, y se prepararán mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la tecnología farmacéutica, tales como los descritos en "Remington's Pharmaceutical Handbook", Mack Publishing Co., N.Y., EE.UU., usando excipientes, diluyentes, cargas, agentes antiapelmazantes, aromatizantes y edulcorantes aceptables para su uso final.

Tal como se menciona, según un aspecto preferido, las composiciones según la invención se formularán como comprimidos bicapa, con una enzima por capa; ambas capas se gastroprotejerán, con una liberación intestinal controlada dependiente del tiempo que dura aproximadamente 4-8 horas. Este tipo de liberación se hace posible mediante el uso, en el núcleo central de cada capa, de methocel o metolosa con diferentes grados de polimerización, mezclados en la relación de 1:1 con avicel o microcel que, a su vez, se premezclan en la relación de 1:1 con una mezcla de manitol y fosfato dicálcico, preconstituidos en la relación de 1:0,5. El recubrimiento de película gastroprotegido se puede obtener después usando goma laca directamente en un recipiente de recubrimiento

industrial con una capacidad de entre 10 y 300 kg, preferentemente 50 kg. Finalmente, el recubrimiento de película puede fabricarse más fuerte mediante una etapa adicional en el recipiente de recubrimiento industrial y el uso concomitante de mezclas de 1:0,5:0,5 de carbonato de amonio, citrato de trietilo y goma laca.

Los ejemplos de formulación según la invención se exponen a continuación.

5 Ejemplo 1) Comprimidos de liberación controlada gastroprotegidos que contienen:

- 80 mg de bromelina
- 50 mg de nattoquinasa

Ejemplo 2) Comprimidos de liberación controlada gastroprotegidos bicapa que contienen, por capa:

- 10
- 160 mg de bromelina
 - 100 mg de nattoquinasa

Ejemplo 3) Granulado gastroprotegido, obtenido en lecho fluido, que contiene:

- 320 mg de bromelina
- 200 mg de nattoquinasa

REIVINDICACIONES

1. Composiciones que comprenden bromelina y nattoquinasa como los únicos principios activos, en las que la relación en peso entre la bromelina y la nattoquinasa es de 1,6:1.
2. Composiciones según la reivindicación 1 en una forma adecuada para administración oral.
- 5 3. Composiciones según la reivindicación 2 en forma de comprimidos bicapa, en los que cada capa contiene una única enzima, y que están gastroprotegidos, con una liberación intestinal controlada dependiente del tiempo que dura aproximadamente 4-8 horas.
4. Combinación de bromelina y nattoquinasa en la relación en peso de 1,6:1 para su uso en el tratamiento de la tromboflebitis.