



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009109358/15, 16.08.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.08.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.08.2006 AT A1376/2006(43) Дата публикации заявки: **27.09.2010** Бюл. № 27(45) Опубликовано: **20.01.2013** Бюл. № 2(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 02/076496 A1, 03.10.2002. US 20030027998 A1, 06.02.2003. WO 98/58666, 30.12.1998. WO 2005/100556 A2, 27.10.2005. US 2006/0083727 A1, 20.04.2006. RU 2268716 C2, 27.01.2006. US 2004/0086337 A1, 06.05.2004. WO 02/089833 A2, 14.11.2002. WO 99/60984 A2, 02.12.1999. DZIVITE I. et al. Regular intake of wobenzym may prevent late complications in diabetes mellitus. Int. J. Immunotherapy XVII (2/3/4) 143-148 (2001).**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **16.03.2009**(86) Заявка РСТ:
AT 2007/000393 (16.08.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/019417 (21.02.2008)

Адрес для переписки:

**105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2,
стр. 1, секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"**

(72) Автор(ы):

**АФТАБ Ахмед (US),
ДЕССЕР Луция (АТ),
ЛОТЦ Бернхард (АТ),
МОР Томас (АТ)**

(73) Патентообладатель(и):

**МАРЛИН НЬЮТРАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)****(54) ЛЕЧЕНИЕ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Применяют, по крайней мере, две протеазы для изготовления лекарства для лечения, и/или профилактики глазных болезней, связанных с неангиогенезом, которые выбирают из группы, состоящей из макулярной дегенерации, связанной с

возрастом (AMD), хориоидальной реваскуляризации, болезни Хиппеля-Линдау, реваскуляризации радужной оболочки, ишемической пролиферативной ретинопатии, реваскуляризации роговой оболочки, и пролиферативной ретинопатии серповидных клеток, где, по крайней мере, одну протеазу выбирают из группы, состоящей из

растительной протеазы. Изобретение обеспечивает уменьшение ангиогенеза при лечении или профилактике глазных болезней,

связанных с неоангиогенезом. 13 з.п. ф-лы, 3 табл., 7 ил., 7 пр.

RU 2 4 7 2 5 2 3 C 2

RU 2 4 7 2 5 2 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009109358/15, 16.08.2007**

(24) Effective date for property rights:
16.08.2007

Priority:

(30) Convention priority:
16.08.2006 AT A1376/2006

(43) Application published: **27.09.2010 Bull. 27**

(45) Date of publication: **20.01.2013 Bull. 2**

(85) Commencement of national phase: **16.03.2009**

(86) PCT application:
AT 2007/000393 (16.08.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/019417 (21.02.2008)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**AFTAB Akhmed (US),
DESSER Lutsija (AT),
LOTTs Bernkhard (AT),
MOR Tomas (AT)**

(73) Proprietor(s):

MARLIN N'JuTRAS'JuTIKALZ, INK. (US)

(54) TREATING OCULAR DISEASES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine. There are applied at least two proteases for preparing a drug for treating and/or preventing ocular diseases related to neoangiogenesis and specified in a group consisting of age-related macular degeneration (AMD), choroidal revascularization, Von Hippel-Lindau disease, iris

revascularisation, ischemic proliferative retinopathy, corneal revascularisation, and proliferative crescent cell retinopathy wherein at least one protease is specified in a group consisting of a group consisting of herbal protease.

EFFECT: invention provides reducing angiogenesis in treating or preventing ocular diseases related to neoangiogenesis.

14 cl, 1 tbl, 7 dwg, 7 ex

RU 2 472 523 C2

RU 2 472 523 C2

Данное изобретение относится к лекарственным препаратам для лечения болезней, связанных с неоангиогенезом.

Ангиогенез определяют как образование новых сосудов при помощи продуктов эндотелиальных клеток из существующих ранее сосудов. Во время этого процесса в
5 эндотелиальных клетках происходит деградация основной базальной мембраны, пролиферация, миграция в соседнюю ткань и сборка в тубы. Наконец, формируются связи от тубы к тубе, и устанавливается кровоток. Способность зрелых тканей к адаптации к изменению условий требует как растворимых факторов, таких как
10 фактор, вызывающий гипоксию (HIF), так и сосудистый эндотелиальный фактор (VEGF), а также клеточно-матричное взаимодействие.

VEGF был первоначально описан как фактор, вызывающий существенную сосудистую проницаемость, и получил название фактора сосудистой
15 проницаемости (VPF). Из-за его митогенетического эффекта в эндотелиальных клетках тот же самый белок был позже переименован в сосудистый фактор эндотелиального роста (VEGF).

VEGF увеличивает проницаемость микрокапиллярного слоя, таким образом, способствуя прохождению жидкости и белка от кровеносных сосудов. Это приводит к
20 развитию отеков, жидкости в ранах и опухолевидных скоплений жидкости под кожей (например, после хирургии), экссудатов (например, в хронических воспалительных болезнях) и асцитам (например, при раке). VEGF является в 10000 раз более мощным, чем гистамин, индуктором сосудистой проницаемости.

Кроме того, VEGF - один из самых мощных стимуляторов пролиферации
25 эндотелиальных клеток. Наконец, это стимулирует образование капилляров из эндотелиальных клеток, таким образом способствуя образованию каскада событий, необходимых для ангиогенеза. Неоангиогенез, рост новых капилляров из существующих ранее сосудов в недавно сформированных тканях или даже
30 отложениях (таких как бляшки и т.д.), способствует развитию и прогрессии множества патологических состояний. При физиологических условиях ангиогенез представляет собой довольно отрегулированный процесс. В патологических условиях, таких как рак, ревматоидный артрит, эндометриоз, псориаз или глазная реваскуляризация, этот процесс значительно усиливается и является дисфункциональным.

Накопление доказательств предполагает, что антиангиогенные лекарства улучшат
35 будущие способы лечения болезней, таких как рак, ревматоидный артрит, псориаз и глазная реваскуляризация и т.д. Эксперименты *in vivo* продемонстрировали, что гипоксия (например, в областях, которые находятся близко от некрозов опухоли)
40 способна к индуцированию экспрессии как рецепторов VEGF, так и VEGF (VEGFR-1) в различных типах клеток. Гипоксия вызывает экспрессию индуцибельного гипоксией фактора - 1 (HIF-1). Как следствие, комплексы HIF-1 накапливаются в ядре клетки, связывают со связывающим участком HIF-1 ДНК и иницируют соответствующую нерегулированную транскрипцию VEGF-м РНК, вызывая ангиогенез, который может
45 спровоцировать вращение смежных кровеносных сосудов в гипоксическую ткань. Кроме того, экспрессия VEGF может быть индуцирована или повышено регулироваться различными воспалительными цитокинами, поскольку это было продемонстрировано в различных моделях хронического воспаления, таких как
50 псориаз или ревматоидный артрит.

VEGF может быть удален из кровообращения через Alpha2-макроглобулин (a2M) маршрут активизированным протеазой a2M. Комплекс a2M-протеазы способен к связыванию VEGF в хранилище на поверхности. Образующийся в результате a2M-

фермент-VEGF комплекс связан с рецептором LRP (имеющий малую плотность белковый рецептор, связанный с рецептором липопротеина), который экспрессируется на поверхности клеток, таких как макрофаги и эндотелиальные клетки, фагоцитозированные и разрушенные. Пероральная терапия с протеолитическими ферментами увеличивает количество активизированных a2M молекул, таким образом, увеличивая способность организмов к разрушению цитокина/фактора роста Desser L et al. Cancer Chemother Pharmacol Suppl (2001) 47:S10-S15; Lauer D et al. Cancer Chemother Pharmacol Suppl (2001) 47:S4-S9).

Недавно было предложено несколько терапевтических подходов с использованием блокаторов рецептора VEGF или антител против VEGF для лечения болезней, включающих усиленный ангиогенез, главным образом рак, но также и болезней, включающих глазной ангиогенез, таких как макулярная дегенерация.

Глазная реваскуляризация, или неоангиогенез, рассматривались как наиболее частая причина слепоты, лежащая в основе патологии приблизительно 20 различных глазных болезней. Например, при диабете новые капилляры, образованные в сетчатке, вторгаются в стекловидный гумор, вызывая кровотечение и слепоту.

WO 2005/110453 относится к использованию человеческих протеаз дикого типа и мутированных протеаз MT-SP1 для того, чтобы расщепить VEGF и рецептор VEGF. Такое расщепление приводит к сокращению ангиогенеза и может, таким образом, быть использовано для лечения патологий, связанных с ангиогенезом.

JP 60112720 A относится к использованию папаина и лимонной кислоты для лечения болезней, которые не связаны с ангиогенезом (например, глаукомы).

В WO 2004/046199 описано использование хондроитин сульфата для лечения глазных болезней.

WO 2005/056784 относится к использованию наттокиназы для лечения диабета.

В SU 1342500 описано использование папаина для лечения таких глазных болезней, как глаукома.

US 6103756 относится к композиции, содержащей антиоксидант и флавоноиды, которые могут быть использованы для лечения глазных болезней.

Объектом данного изобретения является обеспечение лекарств для лечения или профилактики глазных болезней, связанных с неоангиогенезом.

Поэтому данное изобретение относится к использованию, по крайней мере, одной протеазы для изготовления лекарства для лечения и/или профилактики глазных болезней, связанных с неоангиогенезом, которые выбирают из группы, состоящей из возрастной макулярной дегенерации (AMD), хориоидальной реваскуляризации, болезнь Хиппеля-Линдау, реваскуляризации радужной оболочки, ишемической пролиферативной ретинопатии, реваскуляризации роговой оболочки и пролиферативной ретинопатии серповидных клеток, причем, по крайней мере, одну протеазу выбирают из группы, состоящей из растительных, не-млекопитающих животных и микробных протеаз.

Неожиданно было найдено, что, в частности, лекарство, содержащее комбинацию, по крайней мере, одной протеазы, которую предпочтительно выбирают из группы, состоящей из растительных, не-млекопитающих животных и микробных протеаз, позволяет - при введении субъекту - значительно уменьшать (по крайней мере, на 40%, предпочтительно, по крайней мере, на 50%, более предпочтительно, по крайней мере, на 60%, еще более предпочтительно, по крайней мере, на 70%, наиболее предпочтительно, по крайней мере, на 80%, в особенности, по крайней мере, на 90%, по сравнению с уровнем VEGF сказанного субъекта, до введения лекарства в соответствии с данным изобретением) уровень VEGF и, таким образом, уменьшать

ангиогенез. Поэтому, по крайней мере, одна предпочтительно комбинация из, по крайней мере, двух (по крайней мере, трех, по крайней мере, четырех, по крайней мере, пяти, по крайней мере, шести) протеаз может быть использована для профилактики и/или лечения глазных болезней, связанных с неоангиогенезом у субъекта. Введение микробных, не-млекопитающих животных и растительных протеаз является особенно приемлемым, поскольку указанные протеазы не проявляют существенную токсичность при контактировании с человеческими или животными клетками, в особенности с эндотелиальными клетками. Даже комбинация протеаз, как описано в данной заявке, не токсична по отношению к животному или человеку, но влияет на ангиогенез.

Интересным является то, что можно было показать, что протеазы млекопитающего (то есть человеческого и животного) происхождения, такие как трипсин или химотрипсин, не могут ингибировать или предотвратить ангиогенез. Поэтому только введение таких протеаз субъекту не может быть использовано для профилактики или лечения болезней, связанных с неоангиогенезом.

Термин "лекарство", как определено в данной заявке, включает не только фармацевтические продукты, но также и пищевые добавки.

Как используется в данной заявке, термины "растительные протеазы" и "животные протеазы", и "протеаза не-млекопитающих животных" предназначены для обозначения протеаз, которые встречаются в природе в растениях или не-млекопитающих животных и которые экстрагируют или получают из них.

"Растительные протеазы" и "животные протеазы", и "протеаза не-млекопитающих животных" являются также рекомбинантными протеазами, где кодирующие их ДНК (например, такие как кДНК) производят или получают из растений и животных (содержащих указанную ДНК природно в ее геноме) соответственно и клонируют в соответствующие векторы и экспрессируют в прокариотической (например, бактериальной) или эукариотической (например, клетки насекомого, клетки млекопитающих) клеточных культурах.

"Микробные протеазы", как используется в данной заявке, являются протеазами, которые природно встречаются в микроорганизмах, таких как бактерии и грибы (например, дрожжи, плесень). Указанные протеазы могут, однако, быть выделены также из других клеток или организмов, при условии, что указанные клетки и организмы имеют ДНК микробной протеазы и могут произвести указанную протеазу рекомбинантными методами.

Использование лекарства в соответствии с данным изобретением является особенно приемлемым, если глазную болезнь, связанную с ангиогенезом, которая подлежит лечению и/или профилактике, выбирают из упомянутой выше группы. Все эти болезни проявляют усиленный ангиогенез, главным образом, из-за увеличенного уровня сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в организме. Однако особенно предпочтительным является использование лекарства в соответствии с данным изобретением для лечения макулярной дегенерации, связанной с возрастом.

Лекарство в соответствии с данным изобретением может также быть использовано для некоторых болезней, связанных с неоангиогенезом.

Реваскулялизация глаза, например, является наиболее частой причиной слепоты (макулярной дегенерации, связанной с возрастом; болезни Хиппеля-Линдау; синдрома Бехчета; идиопатической глазной реваскуляризации).

Особенно предпочтительным является использование лекарства в соответствии с данным изобретением, для профилактики и/или лечения субъектов, страдающих от

болезней, вызванных высокими уровнями VEGF и связанными ангиогенезом, где такие болезни в основном или полностью не связаны с увеличенной пролиферативной активностью.

По крайней мере, одну растительную протеазу предпочтительно выбирают из группы, состоящей из бромелайна, папаина, фицина и кукумизина.

Растительные протеазы, предпочтительно предназначенные для использования в соответствии с данным изобретением, указаны выше.

Такие протеазы могут быть получены рекомбинантной экспрессией в хозяине, или путем экстракции из растения, которое природно производит указанные протеазы, где экстракция сама по себе может быть непосредственно использована для изготовления лекарства в соответствии с данным изобретением. Способы экстракции протеаз известны из уровня техники.

Например, бромелайн получают из части пня или части корня растения ананаса после сбора урожая фруктов. Эту часть пня или корня собирают в полях, очищают и измельчают, чтобы извлечь сок, содержащий растворимый фермент бромелайн. Дальнейшая обработка включает осаждение фермента для его дальнейшей очистки.

Папаин может быть произведен как сырой, высушенный материал, путем уборки латекса из плодов дерева папайи. Латекс собирают после надреза шеек фруктов, после этого он либо высыхает на плоде, или его по каплям переносят в контейнер. Далее латекс тогда высушивают. Теперь его классифицируют как высушенный, сырой материал. Стадия очистки необходима, чтобы удалить загрязняющие вещества. Такая очистка состоит из солиubilизации и извлечения активного фермента папаина.

Согласно преимущественному воплощению данного изобретения микробную протеазу выбирают из группы, состоящей из наттокиназы, бриназы, проназы, сепрозы, серрапептазы и субтилизина.

Микробные протеазы могут также быть получены рекомбинантными способами или могут быть выделены непосредственно из микробных культур, содержащих микроорганизмы, которые производят указанные протеазы.

Наттокиназу, например, получают из натто, традиционного японского продовольственного продукта, который производят из ферментированной сои, или культур, содержащих организмы конкретного подтипа *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* var. натто), которые могут быть продуцировать указанную протеазу. *Bacillus subtilis* var. натто может быть выделена из природной почвы и японского коммерческого натто. Штамм может продуцировать высокую активность наттокиназных продуктов, которые разлагают фибрин. Источники углерода, органические источники азота или неорганические источники азота, минеральные соли, начальные рН и температуры должны быть оптимизированы для производства наттокиназы из *B. subtilis* var. натто. Было найдено, например, что оптимальный размер прививочного материала *B. subtilis* var. натто составляет приблизительно 5% (в/в). Оптимальная среда может содержать 2,8% белка сои, 1% экстракт дрожжей и 0,8% мальтозы. Кроме того, оптимальное значение рН и температура могут составлять приблизительно 6,5±0,5 и около 30-40°C соответственно. Оптимальный инкубационный период составляет 18-48 часов. Активность наттокиназы в ферментационной среде может увеличиться до более чем 40 ПЕ/мл.

Серрапептаза, например, является протеолитическим ферментом, выделенным из бактерий *Serratia E15*, которые находятся в кишках тутовых шелкопрядов. Этот фермент может быть использован как добавка для лечения боли и воспаления природным путем, и для клинического использования в частях Азии и Европы.

Серрапептазу используют в качестве альтернативы нестероидным противовоспалительным препаратам (NSAIDS), которые обычно используют для лечения артрита и воспаления.

Протеазу животных - не-млекопитающих предпочитают выбирать из группы, состоящей из рептилазы, фермента криля, батроксобина и лимброкиназы.

Такие протеазы могут быть произведены рекомбинантными способами, известными из уровня техники, или получены непосредственно из соответствующих животных.

Особенно предпочтительные лекарства включают бромелайн и/или папаин в качестве растительных протеаз и, необязательно, наттокиназу в качестве микробной протеазы. Предпочтительные соотношения между этими протеазами в лекарственном средстве в соответствии с данным изобретением могут быть найдены в следующей таблице, где количество папаина, наттокиназы и/или бромелайна может варьироваться независимо друг от друга - между 0 и 80%, предпочтительно 10-75%, более предпочтительно 15 (или 16,67) до 75% от общего количества содержания протеазы в лекарственном средстве.

Бромелайн	Наттокиназа	Папаин
75,00%	25,00%	0,00%
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%

Бромелайн	Наттокиназа	Папаин
50,00%	0,00%	50,00%
0,00%	50,00%	50,00%
0,00%	25,00%	75,00%
33,33%	33,33%	33,33%
25,00%	75,00%	0,00%
50,00%	25,00%	25,00%

В соответствии с другим предпочтительным воплощением в соответствии с данным изобретением, по крайней мере, одна растительная протеаза, протеаза животного - не-млекопитающего и/или микробная протеаза содержатся в лекарственном средстве в количестве от 10 до 90% в/в, предпочтительно от 20 до 80% в/в, более предпочтительно от 30 до 70% в/в.

По крайней мере, одну растительную протеазу, протеазу животного - не-млекопитающего и/или микробную протеазу предпочтительно вводят субъекту в количестве 1-100 мг/кг, предпочтительно 2-50 мг/кг, более предпочтительно 5-20 мг/кг массы тела.

Лекарственное средство может предпочтительно дополнительно содержать, по крайней мере, один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент, предпочтительно связывающее вещество, наполнитель, агент, вызывающий дезинтеграцию, увлажняющее вещество, консервант и/или покрытие.

В зависимости от фармацевтической композиции лекарственного средства в соответствии с данным изобретением могут быть использованы различные другие вещества, такие как наполнители, покрытия и т.д.

Дополнительно, лекарственное средство в соответствии с данным изобретением может быть предпочтительно приспособлено к пероральному, местному, брюшному или парентеральному введению.

5 В соответствии с преимущественным воплощением данного изобретения лекарственное средство обеспечено в фармацевтической форме, выбранной из группы, состоящей из глазных капель, ушных капель, капель для носа, назального спрея, таблеток, предпочтительно растворимых таблеток, шипучих таблеток, гастро-стойких
10 таблеток и сублингвальных таблеток, капсул, предпочтительно гастро-стойких капсул, порошков, гранул, жидкостей для перорального применения, капель для перорального применения, мазей, лосьонов, эмульсий, гидрогелей, свечей, пессариев, вливаний и инъекций.

15 В конкретном преимущественном воплощении данного изобретения лекарство приспособлено к пероральному введению. Этот способ введения является неинвазийным и поэтому позволяет повторное введение (не нанося вред пациенту) лекарственного средства.

Лекарственное средство в соответствии с данным изобретением может быть специально составлено для введения в твердой или жидкой форме, включая формы, приспособленные к следующему: (1) пероральное введение, например вливания
20 (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, пилюли, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентеральное введение, например подкожное, внутримышечное или внутривенные инъекции, как, например, стерильные растворы или суспензии; (3) местное применение, например, в виде кремов, мазей или спреев для
25 нанесения на кожу; или (4) интравагинально или интраректально, например, в виде пессариев, кремов или пены.

Выражение "фармацевтически приемлемая" используют в данной заявке, чтобы ссылок на соединения, материалы, составы и/или формы дозировки, которые являются
30 в рамках здравого медицинского суждения подходящими для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерного с целесообразным соотношением пользы/риска.

35 Примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: (1) сахар, такой как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлоза и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8)
40 наполнители, такие как масло какао и воск для суппозиториев; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбитол, маннит и полиэтиленгликоль; (12) эфиры, такие как этил олеат и этил лаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как
45 гидроокись магния и гидроокись алюминия; (15) альгиновая кислота; (16) вода, не содержащая пирогенов; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, которые используют в фармацевтических композициях.

50 Смачивающие агенты, эмульгаторы и увлажнители, такие как натрий лаурил сульфат и стеарат магния, а также красители, агенты высвобождения, агенты покрытия, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты, могут также присутствовать в лекарственном средстве в соответствии с данным

изобретением. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, натрий бисульфат, натрий метабисульфит, сульфит натрия и т.п.; (2) 5 маслорастворимые антиоксиданты, такие как оскорбил пальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропил галлат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) металлохелатные агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбитол, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

10 Композиции в соответствии с данным изобретением включают композиции, приемлемые для перорального, назального, местного (включая буккальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Композиции могут быть традиционно представлены в форме единичных дозировок и могут быть получены любыми способами, известными в фармацевтической области. 15 Количество активного ингредиента, который может быть объединен с материалом носителя, для получения формы единичной дозировки варьируется в зависимости от хозяина, которого лечат, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который может быть объединен с материалом носителя, для получения формы единичной дозировки, вообще, будет составлять такое количество соединения, 20 которое оказывает терапевтическое воздействие.

Способы получения лекарственных средств и композиций в соответствии с данным изобретением включают стадию объединения соединения в соответствии с данным изобретением с носителем и, необязательно, с одним или более дополнительными 25 ингредиентами. Вообще, композиции получают путем однородного и глубокого связывания состава в соответствии с данным изобретением с жидкими носителями, или мелкодисперсными твердыми носителями, или обоими, и затем, в случае необходимости, путем формирования продукта. Композиции в соответствии с 30 изобретением, приемлемые для перорального введения, могут быть в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, лепешек (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и акации или трагаканта), порошков, гранул, или в виде растворов или суспензий в водной или неводной жидкости, или в виде жидких эмульсий типа масло в воде или вода в масле, или в виде сиропа, или пастилок (с использованием 35 инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и акация), каждая из них содержит заранее определенное количество комбинации протеазы в соответствии с данным изобретением в качестве активного ингредиента.

Протеазы в соответствии с данным изобретением можно также вводить как 40 болусы, электуарии или пасты. В твердых формах дозировки в соответствии с данным изобретением для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и т.п.) активный ингредиент смешивают с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как натриевая соль лимонной кислоты или фосфат дикальция, и/или любой из следующих носителей: (1) наполнители 45 или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие агенты, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинил пирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) гигроскопические вещества, такие как глицерин; (4) агенты 50 распада, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5), агентов, замедляющие растворение, такие как керосин; (6) ускорители поглощения, такие как четвертичные соединения аммония; (7) агенты смачивания, такие как, например,

цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) скользящее вещество, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, натрий лаурилсульфат и их смеси; и (10) красители.

5 В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также содержать буферные агенты. Твердые композиции подобного типа могут также быть использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных капсулах желатина, с использованием таких наполнителей, как лактоза или молочный сахар, а
10 также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетка может быть получена прессованием или формированием, необязательно с одним или более дополнительными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены с использованием агентов связывания (например, желатина или
15 гидроксипропилметил целлюлозы), скользящих веществ, инертных разбавителей, консервантов, агентов, вызывающих дезинтеграцию (например, натрий крахмал гликолата или поперечно связанного натрий карбоксиметилцеллюлозы),
поверхностно-активных веществ или диспергаторов. Сформированные таблетки могут быть получены путем формирования в подходящей машине смеси
20 порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем. Таблетки и другие твердые формы дозировки фармацевтических композиций в соответствии с данным изобретением, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут, необязательно, быть получены с покрытиями и оболочками, такими как
25 покрытия для растворения в желудочно-кишечном тракте и другие покрытия, известные в области получения фармацевтических композиций. Они могут также быть сформированы таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента, с использованием, для примера,
гидроксипропилметилцеллюлозы в переменных пропорциях, чтобы обеспечить
30 желательный профиль высвобождения, другие полимерные матрицы, липосомы и/или микросферы. Они могут быть стерилизованы, например, путем фильтрования через удерживающий бактерии фильтр, или путем включения агентов стерилизации в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены в стерильной воде, или некой другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед
35 использованием. Эти композиции могут также необязательно содержать рентгеноконтрастные вещества и могут иметь состав, который позволяет высвобождение активного ингредиента(ов) только, или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта или, необязательно, с замедлением.
40 Примеры композиций включения, которые могут быть использованы, включают полимерные вещества и воски. Протеазы могут также быть в микроинкапсулированной форме, если приемлемо, с одним или более описанных выше наполнителей. Жидкие формы дозировки для перорального введения соединений в соответствии с данным изобретением включают фармацевтически приемлемые
45 эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие формы дозировки могут содержать инертные разбавители, которые обычно используют в данной области, такие как, например, воду или другие растворители, агенты солубилизации и эмульгаторы, такие как
50 этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, семян хлопка, арахисовое, кукурузное, подсолнечное, масличное, касторовое и кунжутное), глицерин, полиэтиленгликоли и жирная эфиры сорбиновых кислот, и их смеси.

Помимо инертных разбавителей композиции для перорального введения могут также содержать адъюванты, такие как агенты смачивания, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие вещества, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтилен сорбитол и эфиры сорбиновых кислот, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, и их смеси.

Составы фармацевтических композиций в соответствии с данным изобретением для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозиториев, которые могут быть получены путем смешивания протеазы в соответствии с данным изобретением с одним или более подходящими нераздражающими эксципиентами или носителями, включающими, например, масло какао, полиэтиленгликоль, воск суппозиториев или эфир салициловой кислоты, которая твердая при комнатной температуре, но тает при температуре тела и поэтому будет таять в прямой кишке или вагинальной полости и высвободить активный состав. Композиции в соответствии с данным изобретением, которые являются подходящими для вагинального введения, также включают pessaries, тампоны, кремы, гели, пасты, пену или распыляют спреи, содержащие такие носители, которые, как известно из уровня техники, являются приемлемыми. Формы дозирования для местного или трансдермального введения соединения в соответствии с данным изобретением включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и средства для ингаляции. Протеазы могут быть смешаны в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или сжатыми жидкостями, которые могут быть необходимыми. Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, в дополнение к активному соединению в соответствии с данным изобретением, эксципиенты, такие как животный и растительный жиры, масла, воски, керосины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и окись цинка, или их смеси. Порошки и спреи могут содержать, в дополнение к протеазам в соответствии с данным изобретением, эксципиенты, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроокись алюминия, силикаты кальция и порошок полиамида, или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать традиционные сжатые жидкости, такие как хлорфторуглероды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество обеспечения контролируемой доставки протеаз в соответствии с данным изобретением в организм. Такие формы дозирования могут быть получены путем растворения или дисперсии протеаз в надлежащей среде. Усилители адсорбции могут также быть использованы для увеличения потока протеаз через кожу. Скорость такого потока может контролироваться или обеспечением мембраны контроля потока, или дисперсией соединения в полимерной матрице или геле.

Офтальмологические композиции, глазные мази, порошки, растворы и т.п. также рассмотрены как такие, что входят в объем данного изобретения.

Фармацевтические композиции в соответствии с данным изобретением подходят для парентерального введения, включают протеазы в соответствии с данным изобретением в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые могут быть

восстановлены в стерильные растворы для инъекций или дисперсии непосредственно перед использованием, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворы, которые сохраняют изотоничность композиции с кровью назначенного реципиента или суспендирующих агентов или загустителей. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях в соответствии с данным изобретением, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, такие как этил олеат. Надлежащая текучесть может быть поддержана, например, при помощи материалов покрытия, таких как лецитин, сохранением необходимого размера частицы в случае дисперсий, и при помощи поверхностно-активных веществ. Эти составы могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, агенты смачивания, эмульгаторы и диспергаторы. Профилактика действия микроорганизмов на композиции, которые рассматриваются, может быть обеспечена включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенол сорбиновой кислоты и т.п. Может также быть желательным включение в композиции изотонических веществ, таких как сахар, поваренная соль и т.п.

Дополнительно, продленное поглощение фармацевтической композиции для инъекций может быть вызвано включением агентов, которые замедляют поглощение, таких как моностеарат алюминия и желатин. В некоторых случаях, чтобы продлить действие препарата, желательно замедлить поглощение препарата после подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто при помощи жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего плохую растворимость в воде. Альтернативно, отсроченное поглощение формы парентерально вводимой формы препарата достигают путем растворения или суспензии препарата в масляном носителе. Формы композиций для инъекций получают путем формирования микрокапсулированных матриц соединений, которые рассматривают, в разлагаемых микроорганизмами полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения препарата и полимера и природы конкретного используемого полимера скорость высвобождения препарата может быть контролируема. Примеры других разлагаемых микроорганизмами полимеров включают поли (ортоэфиры) и поли (ангидриды).

Составы композиций для инъекций также получают путем заключения препарата в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканью тела. Когда протеазы в соответствии с данным изобретением вводят как фармацевтические препараты людям и животным, они могут быть введены отдельно или как фармацевтическая композиция, содержащая, например, 0,1-99,5% (более предпочтительно 0,5-90%) протеаз в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Препараты в соответствии с данным изобретением могут быть введены перорально, парентерально, местно или ректально. Их, конечно, вводят в формах, подходящих для каждого маршрута введения. Например, их вводят в форме таблеток или капсул, инъекций, ингаляций, глазных лосьонов, мазей, суппозитория и т.д., введением инъекций, вливаний или ингаляций; местно в виде лосьонов или мазей; и ректальных суппозитория. Предпочтительными являются пероральные или местные введения.

Выражения "парентеральное введение" и "введенный парентерально", как используется в данной заявке, означает способы введения, кроме брюшного и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения,

внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интаректальное, внутрикапсульное, внутриорбитальное, внутрисердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, интраартикулярное, субкапсулярное, субарахноидальное, интраспинальное и
5 внутригрудинное введение и вливание.

Лекарственное средство в соответствии с данным изобретением может быть введено людям и другим животным для терапии любым подходящим маршрутом введения, включая пероральный, назальный, при помощи, например, спреев,
10 ректально, интравагинально, парентерально, интрацестернально и местно, в виде, например, порошков, мазей или капель, включая буккальный и сублингвальный маршруты. Независимо от выбранного маршрута введения протеазы в соответствии с данным изобретением, которые могут быть использованы в подходящей
15 гидратированной форме, и/или фармацевтических композициях в соответствии с данным изобретением, составляют в фармацевтически приемлемые формы дозирования обычными способами, известными специалистам в данной области.

Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях в соответствии с данным изобретением могут быть различны, чтобы
20 получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композицию и способ введения, не будучи токсичными для пациента. Выбранный уровень дозирования будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретной протеазы
данного используемого изобретения, маршрут введения, время введения, скорость
25 выделения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с используемыми протеазами, возраста, пола, веса, условий, общего здоровья и предварительной истории болезни пациента, которого лечат, и подобных
30 факторов, известных в области медицины. Врач или ветеринар, как специалист в данной области, могут легко определить и предписать эффективное количество необходимой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар могли бы начать с доз протеаз в соответствии с данным изобретением, которые используют в
фармацевтической композиции на уровнях, ниже чем требующиеся для достижения
35 желательного терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку, пока желательный эффект не будет достигнут.

В то время как протеазы в соответствии с данным изобретением возможно вводить отдельно, предпочтительно вводить протеазы в виде как фармацевтической
40 композиции (состава).

В соответствии с другим предпочтительным воплощением данного изобретения лекарственное средство дополнительно включает, по крайней мере, один
дополнительный активный ингредиент.

Указанный активный ингредиент может быть любым ингредиентом, который
45 может поддержать профилактику и лечение ангиогенных болезней протеазами в соответствии с данным изобретением.

Однако, конечно, также возможно добавить активные ингредиенты, демонстрирующие эффекты, отличные от действий указанных протеаз.

По крайней мере один дополнительный активный ингредиент предпочтительно
50 выбирают из группы, состоящей из флавоноидов, конкретно биофлавоноидов, антиоксидантов или других веществ, таких как экстракт коры белой ивы.

В соответствии с другим предпочтительным воплощением данного изобретения

лекарственное средство содержит, по крайней мере, одну (две, три или даже четыре) протеазы, которые выбирают из группы, состоящей из бромелайна, папаина, фицина, наттокиназы, бриназы, проназы, сerraпептазы, рептилазы, фермента криля, батроксобина, лимброкиназы, кукумизина, субтилизина, сепрозы и, необязательно, дополнительный активный ингредиент, где указанный дополнительный активный ингредиент предпочтительно является флавоноидом, конкретно - рутином.

В соответствии с преимущественным воплощением данного изобретения флавоноид выбирают из группы, состоящей из рутина или его производных.

Бромелайн и папаин, например, упоминаются как тиольные протеазы и содержат остаток цистеина на активном участке. При окислении тиольная группа данного цистеина теряет водородный атом и может перекрестно связываться с другой тиольной группой, формируя дисульфидный мостик или, альтернативно, перекрестно связываясь с другим остатком посредством того же самого окислительного процесса. В этом окисленном состоянии бромелайн и папаин теряют активность. Из-за включения антиоксидантного витамина С, таких биофлавоноидов, как рутин и проантоцианины, может быть предотвращено окисление активной сульфгидрильной группы тиольных протеаз.

Лекарственное средство в соответствии с данным изобретением содержит указанный дополнительный активный ингредиент предпочтительно в количестве от 5 до 35% в/в, предпочтительно от 10 до 30% в/в, более предпочтительно от 15 до 25% в/в.

Данное изобретение далее иллюстрировано следующими фигурами и примерами.

На Фигуре 1 показано высвобождение LDH в супернатант из фермента, обработанного HUVES (тестирование токсичности).

На Фигуре 2 показано анализ МТТ ферментом, обработанным HUVES (антипролиферативная активность).

На Фигуре 7(A) показано, что ингибирование VEGF вызывает формирование тубы комбинацией 25% бромелайна, 50% наттокиназы и 25% папаина.

На Фигуре 7(B) показан контроль, обработанный только VEGF. Принимая во внимание, что в контроле VEGF видим узкий образец сформированных труб, фобразец, обработанный ферментом, проявляет широкие области образования нетуб, что указывает на антиангиогенную активность ферментного коктейля.

На Фигуре 4 показана концентрация VEGF в крови пациентов, которую обрабатывали Ритоцимом.

На Фигуре 5 показан МТТ анализ VEGF, стимулировало HUVES и Рутозидом. Не может быть замечено ингибирование пролиферации.

На Фигуре 6 показаны токсические эффекты Рутозида на HUVES. Никакие токсические эффекты не могли быть замечены в неподвижном HUVES, тогда как активизированные HUVES VEGF проявляют небольшой эффект.

На Фигуре 7 (слева) показано ингибирование спонтанного формирования туб в HUVES. Бромелайн, фицин, наттокиназа, папаин и сerraпептаза, но не химотрипсин или трипсин ингибировали формирование туб.

На Фигуре 7 (справа) показано, что ингибирование VEGF вызвало формирование тубы в HUVES. Бромелайн, фицин, наттокиназа, папаин и сerraпептаза, но не химотрипсин или трипсин ингибировали формирование туб почти в той же степени, что и в необработанном HUVES.

ПРИМЕРЫ:

Материалы:

Бромелайн от стебля ананаса с активностью 3,51 Е/мг был получен от Sigma Aldrich,

Австрия,

Наттокиназа с активностью 10,000 Е/мл была куплена от Japan Bio Science Laboratory Co, Ltd.

Папаин от Carica Papaya с активностью >3 Е/мг был получен от Sigma Aldrich, Австрия

Пример 1: Тест на токсичность

Антипролиферативную активность деятельности бромелайна, наттокиназы и папаина оценивали при помощи анализа лактат дегидрогеназы (LDH). Человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVES) от полуконфлюэнтных культур были собраны путем обработки с трипсином, высеянным при плотности 2500 клеток/лунка в микропланшеты на 96 - лунок, предварительно покрытые человеческим фибронектином. Для того, чтобы позволить надлежащее прикрепление, клетки инкубировали в течение 24 часов в эндотелиальной базальной среде 2MV (Cambrex Biochemicals), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 60 мкг/мл ростовой добавки эндотелиальной клетки, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, аскорбиновую кислоту и гепарин. После прикрепления умерщвляли от голода путем инкубации при 37°C/95% влажности в среде 199+10% бычьей эмбриональной сыворотки (FCS) без факторов роста. Через 24 часа супернатант заменяли средой 199, содержащей 10% FCS, VEGF и переменные концентрации ферментов. После окончания инкубационного периода в 48 часов супернатант собирали и проводили анализ LDH согласно инструкциям производителя (Promega, Германия): 50 мкл аликвот от всех лунок переносили в свежую плоскодонную планшету на 96 лунок (ферментативный анализ).

Аналитический буфер добавляли к смеси субстратов и осторожно перемешивали. 50 мкл восстановленной смеси субстратов добавляли к каждой лунке. Планшету инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. 50 мкл стоп-раствора добавляли к каждой лунке. В течение одного часа оптическая плотность была измерена при 490 нм, реперная длина волны составляла 620 нм. Результаты выражены как % от необработанного контроля.

Результаты показаны на Фигуре 1. Они ясно демонстрируют, что бромелайн, наттокиназа и папаин вплоть до уровня включения 25 мкг/мл не проявляли токсического действия на HUVES после 2 дней инкубации.

Пример 2: Антипролиферативная активность

Антипролиферативную активность бромелайна, наттокиназы и папаина и их смесей оценивали, используя анализ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромидом (МТТ). Человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVES) от полуконфлюэнтных культур собирали путем обработки трипсином, отобраным при плотности 1000 клеток/лунка в микропланшеты на 96 -лунок, предварительно покрытые человеческим фибронектином. Чтобы позволить надлежащее прикрепление, клетки инкубировали в течение 24 часов в эндотелиальной базальной среде 2MV (Cambrex Biochemicals), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 60 мкг/мл ростовой добавки эндотелиальной клетки, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, аскорбиновую кислоту и гепарин. После прикрепления клетки умерщвляли голоданием путем инкубации при 37°C/95% влажности в среде 199+10% бычьей эмбриональной сыворотки (FCS) без факторов роста. Через 24 часа супернатант заменяли средой 199, содержащей 10% FCS и переменные концентрации бромелайна, наттокиназы и папаина. Клетки дополнительно инкубировали 48 часов при 37°C/95% влажности. Тест МТТ проводили с использованием набора EZ4U МТТ (Biomedica, Австрия; согласно инструкциям производителя). Оптическую плотность измеряли

при 450 нм, реперная длина волны составляла 620 нм. Результаты выражены как %, где 100% - пролиферация контроля, обработанного VEGF.

Результаты экспериментов концентрация-реакция показывают на Фигуре 2. Они демонстрируют выраженное антипролиферативное действие бромелайна, наттокиназы и папаина, где бромелайн и папаин, достигающего 75%-ного роста при концентрациях 25 мкг/мл. Взятые вместе с результатами теста высвобождения LDH эти данные указывают на выраженное антипролиферативное, но не цитотоксическое действие.

Результаты смесей показаны в Таблице 1. Может быть увиден выраженный антипролиферативный эффект.

Ингибирование Роста HUVEC комбинациями бромелайна, наттокиназы и папаина в присутствии VEGF			
Бромелайн	Наттокиназа	Папаин	% пролиферации
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%

Пример 3: Антиангиогенная активность

Способы: Антиангиогенная активность была оценена при помощи анализа формирования туб. Matrigel (Becton Dickinson, Вена), уменьшающий фактор роста, таял при температуре 4°C. 50 мкл в лунку добавляли пипеткой в лунки микротитрованной планшеты на 96 лунок. Планшету оставляли при 4°C в течение 24 часов. До эксперимента планшету инкубировали в течение 30-60 минут при 37°C, чтобы затвердить гель. HUVEC собирали путем обработки трипсином и отбирали в микропланшеты на 96 лунок, покрытые Matrigel, при плотности 20.000 клеток на лунку в среде эндотелиального роста 2 (MV) (Lonza, Брюссель) с добавлением аскорбиновой кислоты и гидрокортизона согласно инструкциям производителя, а также 5000 Е/мл гепарина 1% эмбриональной бычьей сыворотки. Лекарственные средства и VEGF добавляли до желательных концентраций. Через еще 16-18 часов лунки были сфотографированы. Общая длина туб была определена при помощи программного обеспечения ImageJ, ее измеряли Neuron Length Determination Plugin.

Результаты

Результаты анализов формирования туб ферментов и смесей ферментов приведены на Фиг.3, Фиг.7 и в Таблице 1.

В Таблице 1 показано ингибирование формирования тубы различными смесями бромелайна, наттокиназы и папаины. Результаты четко указывают на:

1. Образование туб ингибировано ферментами бромелайном, фицином, наттокиназой, папаином и серрапептазой.
2. Комбинация бромелайна, наттокиназы и папаина имеет больший эффект, чем данные лекарственные средства отдельно.

Образование туб (% контроля) в HUVEC в присутствии VEGF			
Бромелайн	Наттокиназа	Папаин	% образования туб
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%
5	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%
10	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%

15 Результаты приведены как % формирование туб, где 100% - формированию туб в пробах, которые обрабатывали только VEGF. Было показано, что комбинации не ингибировали формирование туб.

Заключение

20 Существенное уменьшение микрососудов, таких как тубы, опосредованное VEGF, было обнаружено после обработки бромелайном, фицином, наттокиназой, папаином или сerratептазой отдельно, и после обработки смесью ферментов бромелайна, наттокиназы и папаина.

Пример 4:

25 В данном примере было изучено влияние терапии ферментами (смесь ферментов: наттокиназа, бромелайн, папаин + рутиновый биофлавоноид, экстракт коры белой ивы) на количество концентрации VEGF в крови. Можно было бы показать (см. результаты, приведенные ниже), что терапия ферментами значительно уменьшает повышенную концентрацию VEGF в человеческой крови.

30 Испытание было выполнено как рандомизированное, без контроля плацебо, предварительное мультицентральное исследование 111 пациентов обоих полов с диабетом 2 типа в двух параллельных, сопоставимых группах. 54 пациента получили смесь ферментов (наттокиназа (20000 ПЕ/г), 25 мг бромелайн (2450 ЕРЖ/г), 90 мг папаин N.F. (2,400 единиц фармакопеи США/мг). 100 мг комплекса биофлавоноида рутин (рутозиды и рутинозиды), 120 мг экстракта коры белой ивы (15% салицина/7 полифенолов %) 100 мг, Marlyn Nutraceuticals, США) в течение 4 недель. Концентрации VEGF в плазме пациентов были проверены перед дополнением и немедленно через 4 недели после дополнения. Самоконтролем пациентов служили их исходные значения.

40 Концентрации VEGF в крови разделяли в 4 различных группах (квартили; см. Фигуру 4): концентрация VEGF в крови пациентов перед терапией <50 нг/мл; (s50 = начало <50 нг/мл; e50 = конец) s100: концентрация VEGF <100 нг/мл перед терапией; s200:<200 нг/мл перед терапией и s300:>200 нг VEGF перед терапией. Может быть 45 показано, что использование лекарственного средства в соответствии с данным изобретением, которое содержит растительные протеазы завода и/или протеазы микробного происхождения, может быть использовано для уменьшения уровней VEGF в крови и, таким образом, быть использовано для лечения болезней, связанных с неoангиогенезом.

50 Пример 5: Антипролиферативное влияние рутозида на HUVES

Чтобы оценить возможную антипролиферативную активность рутозида, использовали анализ 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид

(МТТ). Человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVEC) из полуэффлюэнтных культур собирали путем обработки трипсином, отобранном при плотности 1000 клеток/лунка в микропланшеты на 96 лунок, предварительно покрытые человеческим фибронектином. Чтобы позволить надлежащее прикрепление, клетки инкубировали в течение 24 часов в эндотелиальной базальной среде 2MV (Cambrex Biochemicals), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 60 мкг/мл ростовой добавки эндотелиальных клеток, hrEGF, hrFGF-2, hrIGF, hrVEGF, аскорбиновую кислоту и гепарин. После прикрепления клетки умерщвляли голодом путем инкубации при 37°C/95% влажности в среде 199+10% бычьей эмбриональной сыворотки (FCS) без факторов роста. Через 24 часа супернатант заменяли средой 199, содержащей 10% FCS и переменные концентрации рутозида и VEGF. Клетки инкубировали еще 48 часов при 37°C/95% влажности. Анализ МТТ проводили с использованием набора EZ4U МТТ (Biomedica, Австрия) согласно инструкциям производителя, оптическая плотность была измерена при 450 нм, реперная длина волны составляла 620 нм. Результаты выражены как % пролиферации, где 100% пролиферация контроля, обработанного VEGF.

Результаты четко указывают на то, что рутозид не ингибирует стимулируемую пролиферацию VEGF HUVEC (см. Фиг.5).

Пример 6: Токсическое влияние рутозида на HUVEC

Чтобы протестировать возможную цитостатическую активность рутозида, использовали анализ лактат дегидрогеназы (LDH). Человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVEC) от полуэффлюэнтных культур собирали обработкой трипсином, отобранном при плотности 2500 клеток/лунка микропланшеты на 96 - лунок, предварительно покрытые человеческим фибронектином. Для того, чтобы позволить надлежащее прикрепление, клетки инкубировали в течение 24 часов в эндотелиальной базальной среде 2MV (Cambrex Biochemicals), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 60 мкг/мл ростовой добавки эндотелиальных клеток, hrEGF, hrFGF-2, hrIGF, hrVEGF, аскорбиновую кислоту и гепарин. После прикрепления клетки умерщвляли голодом путем инкубации при 37°C/95% влажности в среде 199+10 бычьей эмбриональной сыворотки (FCS) без факторов роста. Через 24 часа супернатант заменяли средой 199, содержащей 10% FCS, VEGF и переменные концентрации ферментов. После завершения инкубационного периода в 48 часов супернатант собирали, и анализ LDH проводили согласно инструкциям производителя (Promega, Германия): 50 мкг аликвот из всех лунок переносили в свежую плоскодонную планшету на 96 лунок (ферментативный анализ). К смеси субстратов добавляли аналитический буфер и осторожно перемешивали. 50 мкл восстановленной смеси субстратов добавляли к каждой лунке. Планшету инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. 50 мкл стоп-раствора добавляли к каждой лунке. В течение одного часа оптическая плотность была измерена при 490 нм, реперная длина волны составляла 620 нм. Результаты выражены как % от необработанного контроля.

Результаты четко указывают на то, что токсичность рутозида в HUVEC незначительна (см. Фиг.6).

Пример 7: Ингибирование VEGF растительными протеазами в мышинных моделях ретинопатии, вызванной кислородом, и хориоидальной реваскуляризации, вызванной лазером

Ангиопролиферативная ретинопатия является главной причиной серьезной потери зрения в промышленно развитых странах. Основными заболеваниями являются

диабет, ретинальная венозная окклюзия, ретинопатия преждевременной или поздней возрастной макулярной дегенерации (AMD). Стандартная терапия для ишемической ретинальной болезни основана на разрушении периферийной ткани сетчатки глаза, чтобы минимизировать выработку ангиогенных факторов, таких как VEGF. Так как разрушение нейронной ткани необратимо, была бы желательна местная обработка ингибиторами ангиогенных факторов для защиты пациентов, у которых имеется увеличенный риск развития ретинальной или хориоидальной реваскуляризации. При AMD местная обработка лекарственными средствами, ингибирующими ангиогенез, стала стандартной проблемой нашего времени.

Способы:

А. Кислород - индуцированная ретинопатия (OIR)

Мышиная модель вызванной кислородом ретинопатии (OIR) была основана так, как описано Smith, и коллеги (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35: 101-111) 7-дневные мыши C57/B16J были помещены в 75%-ный кислород до P12. После возвращения к нормальному кислороду у животных развивалась ретинальная реваскуляризация из-за относительной гипоксии. Этот эффект был вызван введением в стекловидное тело тестового соединения в один глаз, в то время как контрольный раствор было введен в другой глаз. Ретинальную пролиферацию оценивали на фоне P17 после перфузии флуоресцеин декстраном. Эти пики позволяют оценивать сосудистые изменения ретинальных сосудов закодированным образом. Баллы согласно системе подсчетов определяли для каждого фона и сравнивали со знаковым ранговым критерием Уилкоксона соответствий пар, приводящим к существенному различию между обработкой и контролем. Использовали в общей сложности 30 мышей на группу.

Во втором тесте тестируемое соединение вводили IP при P12. В этом случае внутриотдельное сравнение между этими двумя глазами невозможно и поэтому была необходима дополнительная контрольная группа. Использовали в общей сложности 25 мышей на группу.

В. Лазер-индуцированная хориоидальная реваскуляризация (laser-CNV)

Мышиная модель для индуцированной лазером хориоидальной реваскуляризации была установлена так, как описано Campochiaro и коллегами (Tobe et al., Am. J. Pathol. (1998) 153: 1641-1646. Мыши C57/B16J, не моложе 12 недель, были обезболены, и реваскуляризация была вызвана 3 визуально управляемыми лазерными ожогами на сетчатке в день 0 (d0). У животных развивалась хориоидальная реваскуляризация на лазерных участках в течение двух недель после поражения. На d7 или через несколько дней тестируемое соединение было введено в стекловидное в один глаз, контрольный раствор - в другой глаз, чтобы оценить влияние на ретинальный или хориоидальный ангиогенез. 13 дней спустя, на d14, животные были обрызганы декстраном-флуоресцеином, и хориоидальные пики были подготовлены. Пики позволяют оценивать сосудистые изменения хлорид и размер CNV-мембраны. Значения для каждого лазерного пятна сравнивали со знаковым ранговым критерием Уилкоксона соответствий пар, приводящим к существенному различию между обработкой и контролем. Использовали в общей сложности 30 мышей на группу.

В дополнительном эксперименте тестируемое соединение было введено IP на P7 или через несколько дней. В этом случае внутриотдельное сравнение между двумя глазами не было возможно и поэтому была необходима дополнительная контрольная группа. Использовали в общей сложности 25 мышей на группу.

Формула изобретения

1. Применение по крайней мере двух протеаз, которые выбирают из группы, состоящей из растительной протеазы, протеазы не млекопитающих и микробных протеаз, для лечения и/или профилактики дегенерации, связанной с возрастом (AMD), где по крайней мере одна протеаза является растительной протеазой.

2. Применение по п.1, которое отличается тем, что микробную протеазу выбирают из группы, состоящей из наттокиназы, проназы, бриназы, сепрозы, серрапептазы и субтилизина.

3. Применение по п.1, которое отличается тем, что растительную протеазу выбирают из группы, состоящей из бромелайна, папаина, фицина и кукумизина.

4. Применение по п.1, которое отличается тем, что протеазу не млекопитающих выбирают из группы, состоящей из рептилазы, фермента криля, батроксобина и лимброкиназы.

5. Применение по п.1, которое отличается тем, что лекарственное средство содержит по крайней мере две протеазы в количестве от 10 до 90% в/в, предпочтительно от 20 до 80% в/в, более предпочтительно от 30 до 70% в/в.

6. Применение по п.1, которое отличается тем, что по крайней мере две протеазы вводят субъекту в количестве 1-100 мг/кг, предпочтительно 2-50 мг/кг, более предпочтительно 5-20 мг/кг массы тела.

7. Применение по п.1, которое отличается тем, что лекарственное средство дополнительно содержит, по крайней мере, один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент, предпочтительно агент связывания, наполнитель, агент, вызывающий дезинтеграцию, скользящее вещество, консервант и/или покрытие.

8. Применение по п.1, которое отличается тем, что лекарственное средство приспособлено для интраокулярного, перорального, местного, брюшного или парентерального введения.

9. Применение по п.1, которое отличается тем, что лекарственное средство обеспечено в фармацевтической форме, которую выбирают из группы, состоящей из глазных капель, ушных капель, капель для носа, назального спрея, таблеток, предпочтительно растворимых таблеток, шипучих таблеток, гастро-стойких таблеток и сублингвальных таблеток, капсул, предпочтительно гастро-стойких капсул, порошков, гранул, жидкостей для перорального введения, капель для перорального введения, мазей, лосьонов, эмульсий, гидрогелей, суппозиториев, пессариев, вливаний и инъекций.

10. Применение по п.1, которое отличается тем, что лекарственное средство дополнительно содержит по крайней мере один дополнительный активный ингредиент.

11. Применение по п.10, которое отличается тем, что по крайней мере один дополнительный активный ингредиент является флавоноидом и/или антиоксидантом.

12. Применение по п.11, которое отличается тем, что флавоноидом является рутин.

13. Применение по п.10, которое отличается тем, что лекарственное средство содержит дополнительный активный ингредиент в количестве от 5 до 35% в/в, предпочтительно от 10 до 30% в/в, более предпочтительно от 15 до 25% в/в.

14. Применение по п.1, которое отличается тем, что лекарственное средство содержит, по крайней мере две протеазы, которые выбирают из группы, состоящей из бромелайна, папаина, фицина, наттокиназы, бриназы, проназы, серрапептазы, рептилазы, фермента криля, батроксобина, лимброкиназы, кукумизина, субтилизина, сепрозы и, необязательно, дополнительного активного ингредиента, где указанный

дополнительный активный ингредиент, предпочтительно, является флавоноидом, конкретно - рутином.

5

10

15

20

25

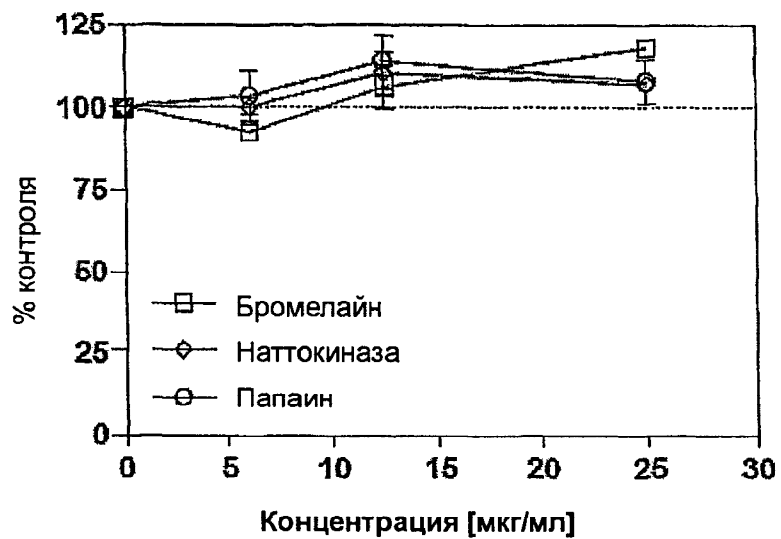
30

35

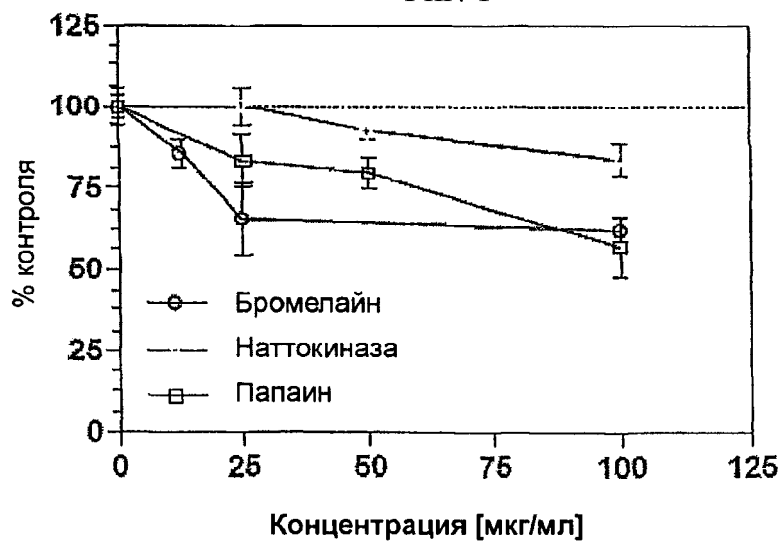
40

45

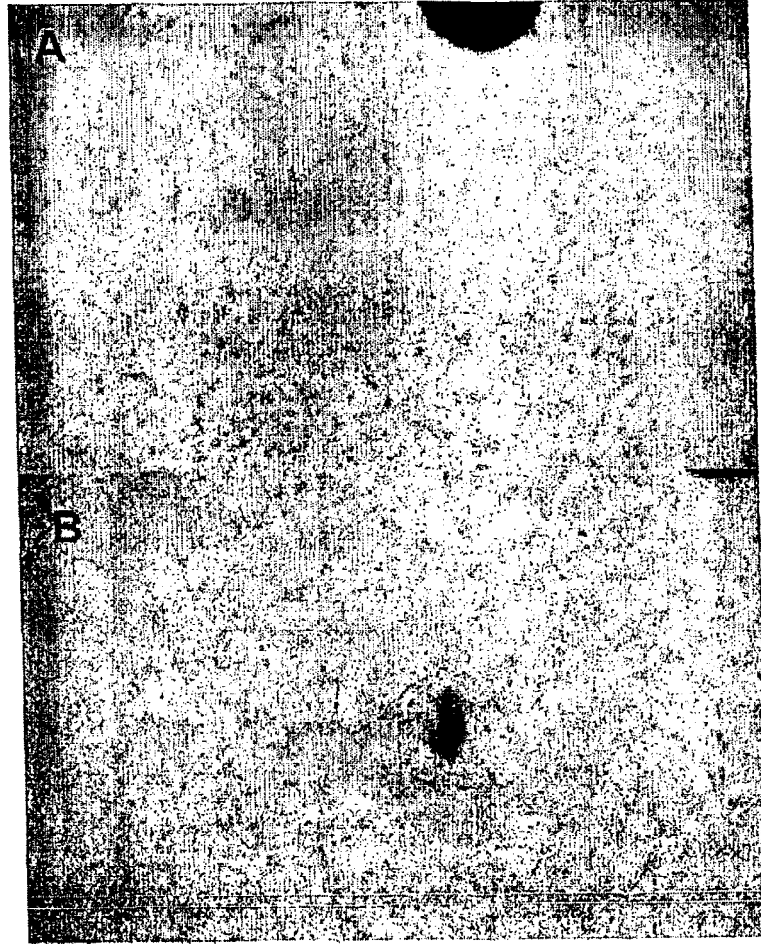
50



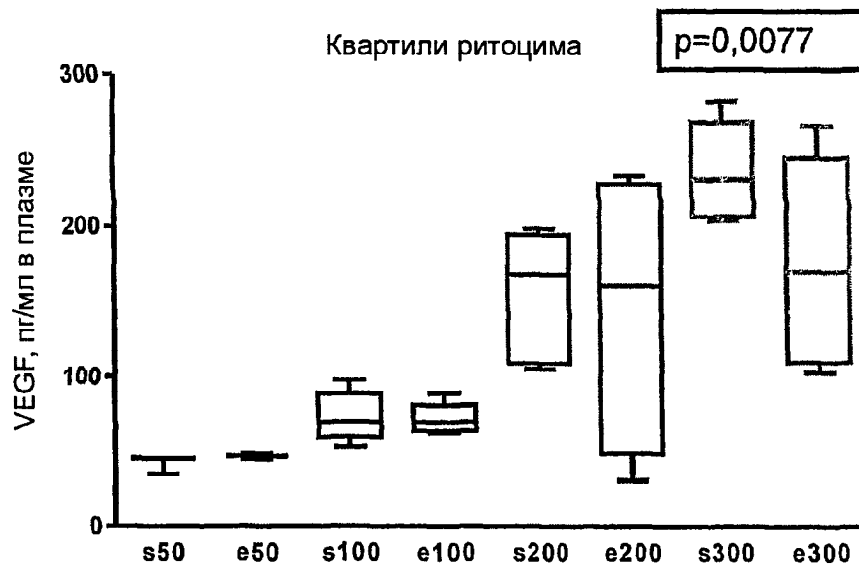
Фиг. 1



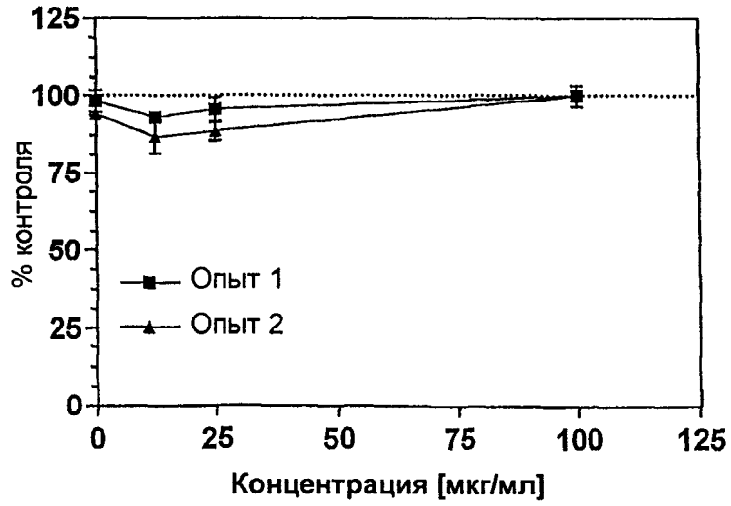
Фиг. 2



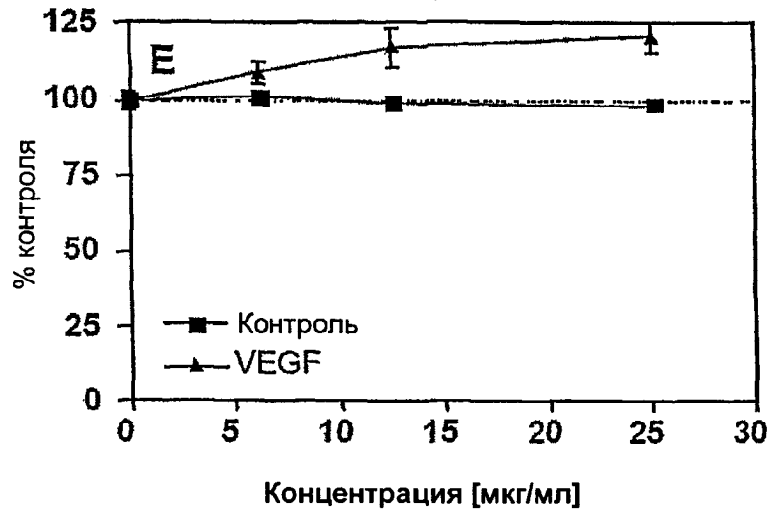
Фиг. 3



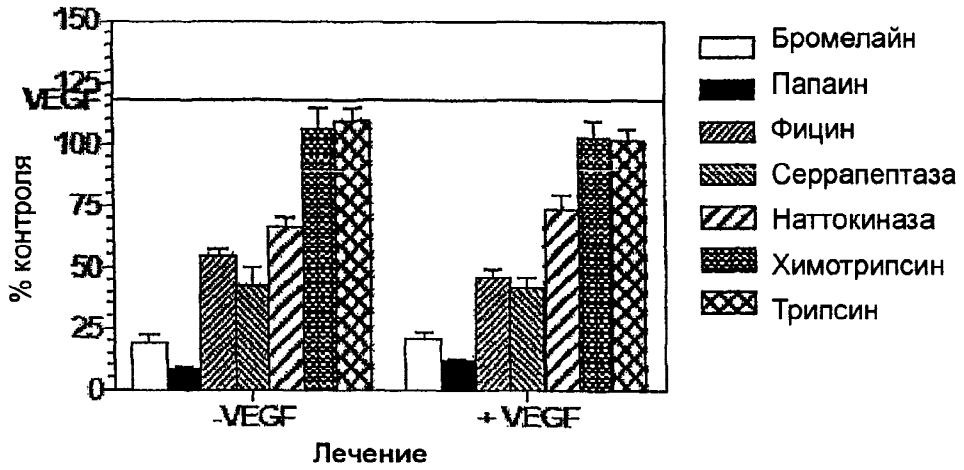
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7