

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1376/2006**

(22) Anmeldetag: **16.08.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.03.2008**

(51) Int. Cl.⁸: **A61K 38/48** (2006.01),
A61K 31/7048 (2006.01),
A61P 27/02 (2006.01)

(73) Patentanmelder:

MARLYN NUTRACEUTICALS, INC.
85040 PHOENIX (US)

(54) **VERWENDUNG VON PROTEASEN**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung mindestens einer Protease zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prävention von Augenkrankheiten.

013041

- 30 -

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung mindestens einer Protease zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prävention von Augenkrankheiten.

NACHGEREICHT

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Medikament zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Neoangiogenese verbunden sind.

Die Angiogenese ist als Bildung neuer Blutgefäße durch Auswüchse von Endothelzellen aus schon vorher bestehenden Gefäßen definiert. Während dieses Prozesses bauen die Endothelzellen die zugrunde liegende Basalmembran ab, vermehren sich, wandern in benachbartes Gewebe und setzen sich zu Röhrchen zusammen. Schließlich werden Verbindungen von Röhrchen zu Röhrchen hergestellt und der Blutstrom etabliert. Die Fähigkeit von reifen Geweben, sich an ändernde Bedürfnisse anzupassen, erfordert sowohl lösliche Faktoren, wie Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF) und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), als auch Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen.

VEGF wurde ursprünglich als Faktor beschrieben, der ein wesentliches vaskuläres Lecken verursacht, und als vaskulärer Permeabilitäts-Faktor (VPE) benannt. Aufgrund seiner mitogenen Wirkung in Endothelzellen wurde dasselbe Protein später in vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) umbenannt.

VEGF erhöht die Permeabilität des mikrovaskulären Betts und fördert so das Austreten von Fluid und Protein aus Blutgefäßen. Das führt zur Entwicklung von Ödemen, Wundflüssigkeit und Seromen (z.B. nach einer Operation), Ergüssen („effusions“, z.B. bei chronischen entzündlichen Erkrankungen) und Aszites (z.B. bei Krebs). VEGF ist 10.000 mal stärker als Histamin bei der Induktion der vaskulären Permeabilität.

Weiters ist VEGF einer der stärksten Stimulatoren der endothelialen Zellproliferation. Schließlich stimuliert er die Bildung von Kapillaren aus Endothelzellen und fördert so die Kaskade von Ereignissen, die für die Angiogenese notwendig sind. Die Neoangiogenese, das Wachstum neuer Kapillaren aus schon vorher bestehenden Gefäßen in neu gebildeten Geweben oder sogar Ablagerungen (wie Plaques usw.) trägt zur Entwicklung und zum Fortschreiten einer Vielfalt von pathologischen Zuständen bei. Unter physiologischen Bedingungen ist die Angiogenese ein fest geregelter Prozess. Unter pathologischen Bedingungen, wie Krebs, rheumatoide Arthritis, Endometriose, Psoriasis oder okulärer Neovaskularisation wird dieser Prozess beträchtlich verstärkt und dysfunktionell.

NACHGEREICHT

Zunehmende Beweise lassen darauf schließen, dass anti-angiogene Arzneimittel zukünftige Therapien für Krankheiten, wie Krebs, rheumatoide Arthritis, Psoriasis und okulare Neovaskularisation und andere, verbessern werden. *In vivo*-Experimente zeigten, dass Hypoxie (z.B. in Regionen in der Nähe von Tumor-Nekrosen) die Expression von sowohl VEGF als auch VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1) bei verschiedenen Arten von Zellen induzieren kann. Die Hypoxie verursacht die Expression von Hypoxie-induzierbarem Faktor-1 (HIF-1). Danach sammeln sich HIF-1-Komplexe im Zellkern an, binden an die HIF-1-Bindungsstelle der DNA und starten die Transkription von VEGF-mRNA bzw. regulieren sie nach oben, was einen angiogenen Schalter auslöst, der bewirken kann, dass benachbarte Blutgefäße in das hypoxische Gewebe einsproßen. Weiters kann die VEGF-Expression durch verschiedene proinflammatorische Zytokine induziert/hochreguliert werden, wie bei verschiedenen Modellen chronischer Entzündungen, wie Psoriasis oder rheumatoider Arthritis, gezeigt wurde.

VEGF kann aus dem Blutkreislauf über den Alpha2-Makroglobulin (a2M)-Weg durch Protease-aktiviertes a2M entfernt werden. Der a2M-Protease-Komplex kann VEGF in einer Wölbung an der Oberfläche binden. Der resultierende a2M-Enzym-VEGF-Komplex wird an den LRP-Rezeptor (low-density lipoprotein receptor-related protein receptor) gebunden, an der Oberfläche von Zellen, wie Makrophagen und Endothelzellen, exprimiert, phagozytiert und zerstört. Die orale Therapie mit proteolytischen Enzymen steigert die Anzahl der aktivierten a2M-Moleküle und erhöht so die Zytokin/Wachstumsfaktor-zerstörende Kapazität der Organismen (Desser L. et al., *Cancer Chemother. Pharmacol. Suppl.* (2001) 47:S10-S15; Lauer D. et al., *Cancer Chemother. Pharmacol. Suppl.* (2001) 47:S4-S9).

Kürzlich wurden mehrere therapeutische Ansätze unter Verwendung von VEGF-Rezeptor-Blockern oder Antikörpern gegen VEGF für die Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gesteigerten Angiogenese verbunden sind, hauptsächlich Krebs, aber auch für Erkrankungen, die mit einer Angiogenese im Auge verbunden sind, wie Makuladegeneration, vorgeschlagen.

Die okulare Neovaskularisation oder Angiogenese wurde als die häufigste Ursache der Blindheit impliziert und liegt der Pathologie von etwa 20 verschiedenen Augenkrankheiten zugrunde. Z.B. bei Diabetes dringen neue, in der Retina gebildete Kapilla-

ren in den Glaskörperhumor ein und verursachen Bluten und Blindheit.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Medikamente zur Behandlung oder Prävention von Augenkrankheiten, die mit einer Neoangiogenese verbunden sind, vorzusehen.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von mindestens einer Protease zur Erzeugung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prävention von Augenkrankheiten, vorzugsweise von Augenkrankheiten, die mit einer Neoangiogenese verbunden sind.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass insbesondere ein Medikament, das mindestens eine Protease umfasst, die vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus pflanzlichen, tierischen und mikrobiellen Proteasen, bei Verabreichung an ein Individuum eine signifikante Reduktion (mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 50%, mehr bevorzugt mindestens 60%, noch mehr bevorzugt mindestens 70%, am meisten bevorzugt mindestens 80%, insbesondere mindestens 90% im Vergleich zur VEGF-Menge des Individuums vor Verabreichung des Medikaments gemäß der vorliegenden Erfindung) der Menge an VEGF ermöglicht und somit die Angiogenese verringert. Daher kann mindestens eine, vorzugsweise eine Kombination von mindestens zwei (mindestens drei, mindestens vier, mindestens fünf, mindestens sechs) Protease(n) verwendet werden, um Augenkrankheiten, die mit einer Neoangiogenese verbunden sind, bei einem Individuum zu verhindern und/oder zu behandeln. Die Verabreichung von mikrobiellen, tierischen und pflanzlichen Proteasen ist besonders geeignet, weil diese Proteasen keine signifikante Toxizität aufweisen, wenn sie mit menschlichen oder tierischen Zellen, insbesondere mit Endothelzellen, in Kontakt kommen. Selbst eine Kombination von Proteasen, wie hierin geoffenbart, ist nicht toxisch für ein Tier oder einen Menschen, sondern wirkt auf die Angiogenese.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Proteasen von Säuger(d.h. humanem oder tierischem)-Ursprung die Angiogenese nicht inhibieren oder verhindern können. Daher kann die alleinige Verabreichung solcher Proteasen an ein Individuum nicht zur Verhinderung oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Neoangiogenese verbunden sind, verwendet werden.

Der Ausdruck „Medikament“, wie hierin definiert, inkludiert nicht nur pharmazeutische Produkte, sondern auch Nahrungsergän-

zungsmittel.

Wie hierin verwendet, sollen „pflanzliche Proteasen“ und „tierische Proteasen“ Proteasen sein, die von Natur aus in Pflanzen oder Tieren (nicht-Säuger-Tieren) vorkommen und daraus extrahiert oder erhalten werden. „Pflanzliche Proteasen“ und „tierische Proteasen“ sind auch rekombinante Proteasen, deren codierende DNA (z.B. als cDNA) aus einer Pflanze bzw. einem Tier (die diese DNA von Natur aus in ihrem/seinem Genom aufweist) abgeleitet oder erhalten wurde und in geeignete Vektoren kloniert und in einer prokaryontischen (z.B. bakteriellen) oder einer eukaryontischen (z.B. Insektenzelle, Säugerzelle) Zellkultur exprimiert wurde.

„Mikrobielle Proteasen“, wie hierin verwendet, sind Proteasen, die von Natur aus in Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilzen (z.B. Hefen, Schimmelpilzen) vorkommen. Diese Proteasen können jedoch auch aus anderen Zellen oder Organismen isoliert werden, vorausgesetzt, dass diesen Zellen und Organismen die DNA der mikrobiellen Protease innewohnt und sie diese Protease rekombinant erzeugen können.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die angiogene Erkrankung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Adamantiadis-Behcet-Syndrom, altersbezogene Makuladegeneration (AMD), choroidale Neovaskularisation, diabetische Retinopathie, hypertone Retinopathie, von-Hippel-Lindau-Syndrom, idiopathische polypoidale choroidale Vaskulopathie, idiopathische okuläre Neovaskularisation, Iris-Neovaskularisation, ischämische proliferative Retinopathie, Neovaskularisation der Hornhaut, neovaskuläres Glaukom, proliferative Sichelzellen-Retinopathie, proliferative Vitreoretinopathie (PVR), retinale angiomatöse Proliferation (RAP) und retrodentale Fibroplasie.

Die Verwendung des Medikaments gemäß der vorliegenden Erfindung ist besonders geeignet, wenn die zu behandelnde oder zu verhindernde, mit einer Angiogenese verbundene Augenkrankheit aus der oben angeführten Gruppe ausgewählt ist. Alle diese Krankheiten zeigen eine verstärkte Angiogenese, die vor allem auf eine erhöhte Menge des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) im Körper zurückzuführen ist.

Mehrere Krankheiten sind mit einer Neoangiogenese verbunden, für welche das Medikament der vorliegenden Erfindung ebenfalls verwendet werden kann.

Die Neovaskularisation des Auges ist beispielsweise die häufigste Ursache für Blindheit (altersbezogene Makuladegeneration; diabetische Retinopathie; von Hippel-Lindau-Syndrom; Behcet-Syndrom; idiopathische okuläre Neovaskularisation).

Die entzündliche Darmerkrankung, deren präzise Ätiologie noch immer unbekannt ist, besteht aus zwei Formen einer chronischen intestinalen Entzündung; ulcerative Colitis und Morbus Crohn. Bei ihrer Pathogenese ist auch ein abnormes Mikrozirkulationssystem impliziert.

Lungenödem ist ein häufiges klinisches Problem, das auftritt, wenn Flüssigkeit rascher in die Lunge einsickert als sie aus dieser entfernt wird. Es konnte (in einem Maus-Modell) gezeigt werden, dass ein akutes Lungenödem durch VEGF induziert und durch lösliche VEGF-Rezeptoren inhibiert werden kann. TGF-beta stimuliert die VEGF-Expression in der Pleuralflüssigkeit, und die Konzentration des VEGF in der Pleuralflüssigkeit korreliert signifikant mit dem Volumen des Pleuraergusses im Tiermodell.

VEGF ist ein angiogenes Cytokin, das von vielen humanen und tierischen Tumoren exprimiert wird. Es zeigte sich, dass VEGF mit den grundlegenden Merkmalen des Tumorstwachstums verbunden ist, wie Neoangiogenese einschließlich Mikrogefäßdichte und Gefäßbauweise sowie Tumor-Wachstumsrate und Entwicklung von Tumor-Metastasen (vgl. auch z.B. Cervix-Carcinom, Magenkrebs, hepatocelluläres Carcinom, intrakranielle Meningiome, Kaposi-Sarkom, Lungenkrebs, Eierstockkrebs, Prostatakrebs).

Die Endometriose ist eine Erkrankung, bei welcher Endometrium-Gewebe, das Gewebe, welches das Innere der Gebärmutter auskleidet, außerhalb der Gebärmutter wächst und sich an anderen Organen in der Bauchhöhle, wie Eierstöcken und Eileitern, festsetzt. Die Endometriose ist eine fortschreitende Krankheit, die im Laufe der Zeit zur Verschlechterung neigt und nach Behandlung wieder auftreten kann. Zu den Symptomen zählen schmerzhafte Menstruationen, abnorme Menstruationsblutung und Schmerzen während oder nach dem Geschlechtsverkehr. 10% der weiblichen Bevölkerung können an Endometriose leiden, welche auch eine Ursache für die Unfruchtbarkeit bei Frauen ist. Die Neoangiogenese und Gefäß-Remodellierung spielen beim zyklischen Wachstum und der Regression des Endometriums eine wesentliche Rolle. In vitro gezüchtetes Endometrium erzeugt VEGF, der die Angiogenese fördert.

NACHGEREICHT

Nasenpolypen sind ein Modell für eine chronische Entzündung und ein Ödem. Die Expression von TGF-beta und VEGF ist bei Nasenpolypen erhöht und könnte eine Schlüsselrolle bei der Bildung eines schweren Ödems spielen und könnte zu einigen der pathologischen Veränderungen beitragen, die bei Nasenpolypen beobachtet werden, wie eine Verdickung der epithelialen Basalmembran und Stromafibrose; Eosinophile bei Nasenpolypen stellen eine Hauptquelle des TGF-beta 1 und möglicherweise auch des VEGF dar.

Erhöhte Mengen des Gefäßwachstumsfaktors sowie des Angiogenese-Inhibitors Endostatin sind bei übergewichtigen und fettleibigen Individuen vorhanden und könnten zum erhöhten Metastasen-Risiko bei fettleibigen Individuen mit Krebs beitragen.

Eine aberrante Angiogenese ist häufig mit der Bildung von Läsionen bei chronischer Periodontitis verbunden. Der VEGF könnte mit der Ätiologie von Periodontitis in ihren frühen Stadien verbunden sein gemäß der Neovaskularisation, die durch Schwellung und Ödem verursachende periodontale Pathogene stimuliert wird.

Das POEMS-Syndrom oder Crow-Fukase-Syndrom ist eine seltene Multisystem-Erkrankung, die durch eine Polyneuropathie, Organomegalie, Endokrinopathie und Hautveränderungen gekennzeichnet ist. Die Serum-VEGF-Spiegel sind etwa 15 bis 30 mal höher als bei Kontrollen und anderen neurologischen Erkrankungen. Der Pathomechanismus der Polyneuropathie bei POEMS-Syndrom kann auf die Beteiligung der Blut-Nerven-Schranke durch eine durch VEGF induzierte erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität zurückzuführen sein.

Rosacea befällt weltweit über 45 Millionen Menschen. Sie beginnt mit Wallungen und Rötung der Gesichtsmitte und über die Wangen, Nase oder Stirn, kann aber auch den Nacken, den Brustkorb, den Haarboden oder die Ohren betreffen. Das Hauptmerkmal von Rosacea ist durch eine unkontrollierte Angiogenese gekennzeichnet. Die Verringerung der VEGF-Expression könnte eine Haut-Neoangiogenese bei diesen Hauterkrankungen verhindern.

Es ist besonders bevorzugt, das Medikament der vorliegenden Erfindung zur Verhinderung und/oder Behandlung von Individuen zu verwenden, die an Erkrankungen leiden, welche durch hohe VEGF-Mengen verursacht und mit einer Angiogenese verbunden sind, wobei diese Krankheiten nicht hauptsächlich oder vollständig mit einer verstärkten proliferativen Aktivität verbunden sind.

NACHGEREICHT

Die mindestens eine Pflanzen-Protease ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bromelain, Papain, Ficin und Cucumisin.

Die vorzugsweise gemäß der obigen Erfindung zu verwendenden Pflanzen-Proteasen sind oben angeführt.

Diese Proteasen können durch rekombinante Expression in einem Wirt oder durch Extraktion aus einer Pflanze, die diese Proteasen natürlicherweise erzeugt, erhalten werden, wobei der Extrakt selbst direkt verwendet werden kann, um das Medikament gemäß der vorliegenden Erfindung herzustellen. Extraktionsmethoden der Proteasen sind auf dem Gebiet wohl bekannt.

Beispielsweise wird Bromelain aus dem Strunk- oder Wurzelteil der Ananas-Pflanze nach dem Ernten der Frucht gewonnen. Dieser Strunk- oder Wurzelteil wird von den Feldern gesammelt, geschält und zerkleinert, um den das lösliche Bromelain-Enzym enthaltenden Saft zu extrahieren. Die weitere Bearbeitung inkludiert das Ausfällen des Enzyms, um es weiter zu reinigen.

Papain kann als rohes, getrocknetes Material erzeugt werden, indem der Latex von der Frucht des Papaya-Baums gesammelt wird. Der Latex wird gesammelt, nachdem der Hals der Frucht angeritzt wurde, wonach er entweder auf der Frucht trocknen kann oder in einen Behälter tropfen kann. Dieser Latex wird dann weiter getrocknet. Er ist nun als getrocknetes, rohes Material klassifiziert. Ein Reinigungsschritt ist nötig, um verunreinigende Substanzen zu entfernen. Diese Reinigung besteht aus dem Solubilisieren und Extrahieren des aktiven Papain-Enzyms.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die mikrobielle Protease ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nattokinase, Brinase, Seaprose und Subtilisin.

Mikrobielle Proteasen können auch mit rekombinanten Techniken erhalten werden oder direkt aus Mikroben-Kulturen, die diese Proteasen erzeugenden Mikroorganismen umfassen, isoliert werden.

Die Nattokinase wird beispielsweise aus Natto, einem traditionellen japanischen Nahrungsmittelprodukt erhalten, das aus fermentierten Sojabohnen hergestellt wird, oder durch Kulturen, die Organismen einer spezifischen *Bacillus subtilis*-Subspezies (*Bacillus subtilis* var. *natto*) aufweisen, welche diese Protease erzeugen können. *Bacillus subtilis* var. *natto* kann aus natürlichem Erdreich und japanischem, handelsüblichem Natto isoliert

werden. Der Stamm hat die Fähigkeit, eine große Aktivität der Nattokinase-Produkte zu erzeugen, die Fibrin abbauen. Kohlenstoffquellen, organische Stickstoffquellen oder anorganische Stickstoffquellen, Mineralsalze, anfänglicher pH und Temperaturen müssen für die Nattokinase-Produktion aus *B. subtilis* var. *natto* optimiert werden. Es stellte sich beispielsweise heraus, dass die optimale Inokulum-Größe von *B. subtilis* var. *natto* um die 5% (V/V) liegt. Das optimale Medium kann 2,8% Sojabohnen-Protein, 1% Hefeextrakt und 0,8% Maltose enthalten. Weiters können der optimale pH-Wert und die optimale Temperatur um $6,5 \pm 0,5$ bzw. um 30°C bis 40°C liegen. Die optimale Inkubationsdauer ist 18 bis 48 Stunden. Die Nattokinase-Aktivität im Fermentationsmedium kann auf über 40 FU/ml ansteigen.

Die tierische (nicht-Säugetier) Protease ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Serrapeptase, Reptilase, Elastase und Lumbrokinase.

Diese Proteasen können rekombinant mit auf dem Gebiet bekannten Methoden erzeugt oder direkt aus den entsprechenden Tieren erhalten werden.

Serrapeptase ist z.B. ein aus Seidenraupen isoliertes proteolytisches Enzym. Dieses Enzym kann als Ergänzung zur natürlichen Behandlung von Schmerzen und Entzündungen verwendet werden und ist in Teilen Asiens und Europas in klinischer Verwendung. Serrapeptase wird als Alternative zu nicht-steroidalen entzündungshemmenden Arzneimitteln (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDS), die allgemein zur Behandlung von Arthritis und Entzündungen verwendet werden, benützt.

Besonders bevorzugte Medikamente umfassen Bromelain und/oder Papain als Pflanzen-Proteasen und gegebenenfalls Nattokinase als mikrobielle Protease. Die bevorzugten Verhältnisse zwischen diesen Proteasen in einem Medikament gemäß der vorliegenden Erfindung kann man der folgenden Tabelle entnehmen:

| Bromelain | Nattokinase | Papain |
|------------------|--------------------|---------------|
| 75,00% | 25,00% | 0,00% |
| 16,67% | 16,67% | 66,67% |
| 25,00% | 25,00% | 50,00% |
| 0,00% | 75,00% | 25,00% |

| Bromelain | Nattokinase | Papain |
|------------------|--------------------|---------------|
| 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% |
| 25,00% | 75,00% | 0,00% |
| 50,00% | 25,00% | 25,00% |

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die mindestens eine pflanzliche, tierische und/oder mikrobielle Protease im Medikament in einer Menge von 10 bis 90% Gew./Gew., vorzugsweise von 20 bis 80% Gew./Gew., mehr bevorzugt von 30 bis 70% Gew./Gew. enthalten.

Die mindestens eine pflanzliche, tierische und/oder mikrobielle Protease wird vorzugsweise in einer Menge von 1 bis 100 mg/kg, vorzugsweise 2 bis 50 mg/kg, mehr bevorzugt 5 bis 20 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Das Medikament kann vorzugsweise weiters mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, Verdünnungsmittel und/oder Exzipienten, vorzugsweise ein Bindemittel, einen Füllstoff, ein Zerfallsmittel, ein Gleitmittel, ein Konservierungsmittel und/oder einen Überzug aufweisen.

Je nach der pharmazeutischen Formulierung des Medikaments gemäß der vorliegenden Erfindung können verschiedene andere Substanzen, wie Exzipienten, Überzüge usw. verwendet werden.

Weiters kann das Medikament der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zur oralen, topischen, enteralen oder parenteralen Verabreichung ausgelegt sein.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Medikament in einer pharmazeutischen Form, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Augentropfen, Ohrentropfen, Nasentropfen, Nasenspray, Tabletten, vorzugsweise löslichen Tabletten, Brausetabletten, Magensaft-resistenten Tabletten und

Sublingual-Tabletten, Kapseln, vorzugsweise Magensaft-resistenten Kapseln, Pulvern, Granula, oralen Flüssigkeiten, oralen Tropfen, Salben, Lotionen, Emulsionen, Hydrogelen, Suppositorien, Pessaren, Infusionen und Injektionen vorgesehen.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Medikament zur oralen Verabreichung ausgelegt. Diese Art der Verabreichung ist nicht-invasiv und gestattet daher eine wiederholte Verabreichung des Medikaments (ohne den Patienten zu verletzen).

Das Medikament der vorliegenden Erfindung kann besonders zur Verabreichung in fester oder flüssiger Form formuliert werden, einschließlich jener Formen, die für Folgendes ausgelegt sind: (1) orale Verabreichung, beispielsweise als Arzneitrank (wässrige oder nicht-wässrige Lösungen oder Suspensionen), Tabletten, Bolusse, Pulver, Granula, Pasten zum Auftragen auf der Zunge; (2) parenterale Verabreichung, beispielsweise mittels subkutaner, intramuskulärer oder intravenöser Injektion, wie z.B. eine sterile Lösung oder Suspension; (3) topische Anwendung, beispielsweise als Creme, Salbe oder Spray, welche(s) auf die Haut aufgetragen wird; oder (4) intravaginal oder intrarektal, beispielsweise als Pessar, Creme oder Schaum.

Der Ausdruck „pharmazeutisch akzeptabel“ wird hierin zur Bezeichnung jener Verbindungen, Materialien, Zusammensetzungen und/oder Dosierungsformen verwendet, die im Bereich der vernünftigen medizinischen Beurteilung zur Verwendung in Kontakt mit dem Gewebe von Menschen und Tieren ohne übermäßige Toxizität, Irritation, allergische Reaktion oder anderes Problem oder Komplikation geeignet sind, entsprechend einem vernünftigen Nutzen/Risiko-Verhältnis.

Zu den Beispielen für Materialien, die als pharmazeutisch akzeptable Träger dienen können, zählen: (1) Zucker, wie Lactose, Glucose und Saccharose; (2) Stärken, wie Maisstärke und Kartoffelstärke; (3) Cellulose und ihre Derivate, wie Natriumcarboxymethylcellulose, Ethylcellulose und Celluloseacetat; (4) pulverisierter Tragant; (5) Malz; (6) Gelatine; (7) Talkum; (8) Exzipienten, wie Kakaobutter und Suppositorien-Wachse; (9) Öle, wie Erdnussöl, Baumwollsaamenöl, Distelöl, Sesamöl, Olivenöl, Maisöl und Sojabohnenöl; (10) Glycole, wie Propylen-glycol; (11) Polyole, wie Glycerin, Sorbit, Mannit und Polyethylenglycol; (12) Ester, wie Ethyloleat und Ethyllaurat; (13)

Agar; (14) Puffermittel, wie Magnesiumhydroxid und Aluminiumhydroxid; (15) Alginsäure; (16) pyrogenfreies Wasser; (17) isotonische Kochsalzlösung; (18) Ringer-Lösung; (19) Ethylalkohol; (20) Phosphat-Pufferlösungen; und (21) andere nicht-toxische, kompatible Substanzen, die in pharmazeutischen Formulierungen verwendet werden.

Benetzungsmittel, Emulgatoren und Gleitmittel, wie Natriumlaurylsulfat und Magnesiumstearat, sowie Farbstoffe, Trennmittel, Überzugsmittel, Süßungsmittel, Geschmacksmittel und Parfümierungsmittel, Konservierungsmittel und Antioxidantien können ebenfalls im Medikament gemäß der vorliegenden Erfindung vorhanden sein. Zu den Beispielen für pharmazeutisch akzeptable Antioxidantien zählen: (1) wasserlösliche Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, Cysteinhydrochlorid, Natriumbisulfat, Natriummetabisulfit, Natriumsulfit u. dgl.; (2) in Öl lösliche Antioxidantien, wie Ascorbylpalmitat, butyliertes Hydroxyanisol (BHA), butyliertes Hydroxytoluol (BHT), Lecithin, Propylgallat, Alpha-Tocopherol u. dgl.; und (3) Metall-Chelatbildner, wie Zitronensäure, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sorbit, Weinsäure, Phosphorsäure u. dgl.

Zu den Formulierungen der vorliegenden Erfindung zählen jene, die zur oralen, nasalen, topischen (einschließlich bukkalen und sublingualen), rektalen, vaginalen und/oder parenteralen Verabreichung geeignet sind. Die Formulierungen können praktischerweise in Dosisform vorliegen und können mit allen auf dem Gebiet der Pharmazie bekannten Verfahren hergestellt werden. Die Menge an aktivem Ingredienz, die mit einem Trägermaterial zur Erzeugung einer Einzeldosis-Form kombiniert werden kann, hängt vom behandelten Wirt und von der besonderen Verabreichungsart ab. Die Menge an aktivem Ingredienz, die mit einem Trägermaterial zur Erzeugung einer Einzeldosis-Form kombiniert werden kann, ist im Allgemeinen jene Menge der Verbindung, die eine therapeutische Wirkung erzeugt.

Verfahren zur Herstellung der Medikamente und Formulierungen gemäß der vorliegenden Erfindung inkludieren den Schritt des In-Verbindung-Bringens einer Verbindung der vorliegenden Erfindung mit dem Träger und gegebenenfalls mit einem oder mehreren zusätzlichen Ingredienzien. Im Allgemeinen werden die Formulierungen hergestellt, indem eine Verbindung der vorliegenden Erfindung einheitlich und eng mit flüssigen Trägern oder fein-

teiligen festen Trägern oder beiden in Verbindung gebracht wird und danach, soferne nötig, das Produkt geformt wird. Formulierungen der Erfindung, die zur oralen Verabreichung geeignet sind, können in Form von Kapseln, Cachets, Pillen, Tabletten, Lutschtabletten (unter Verwendung einer mit Geschmacksstoffen versehenen Basis, üblicherweise Saccharose und Gummiarabicum oder Tragant), Pulvern, Granula oder als Lösung oder als Suspension in einer wässrigen oder nicht wässrigen Flüssigkeit, oder als flüssige Öl-in-Wasser- oder Wasser-in-Öl-Emulsion, oder als Sirup, oder als Pastillen (unter Verwendung einer inerten Basis, wie Gelatine und Glycerin, oder Saccharose und Gummiarabicum) vorliegen, die jeweils eine vorbestimmte Menge einer Protease-Kombination der vorliegenden Erfindung als aktive Ingredienzien enthalten.

Die Proteasen der vorliegenden Erfindung können auch als Bolus, Electuarium oder Paste verabreicht werden. Bei festen Dosierungsformen der Erfindung zur oralen Verabreichung (Kapseln, Tabletten, Pillen, Dragees, Pulver, Granula u. dgl.) ist das aktive Ingredienz mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern, wie Natriumcitrat oder Dicalciumphosphat, und/oder einem von Folgendem gemischt: (1) Füllstoffe oder Streckmittel, wie Stärken, Lactose, Saccharose, Glucose, Mannit und/oder Kieselsäure; (2) Bindemittel, wie beispielsweise Carboxymethylcellulose, Alginate, Gelatine, Polyvinylpyrrolidon, Saccharose und/oder Gummiarabicum; (3) Befeuchtungsmittel, wie Glycerin; (4) Zerfallsmittel, wie Agar-Agar, Calciumcarbonat, Kartoffel- oder Tapioca-Stärke, Alginsäure, bestimmte Silicate, und Natriumcarbonat; (5) Lösungsverzögerungsmittel, wie Paraffin; (6) Absorptionsbeschleunigern, wie quaternäre Ammoniumverbindungen; (7) Netzmittel, wie z.B. Cetylalkohol und Glycerinmonostearat; (8) Absorptionsmittel, wie Kaolin- und Bentonit-Ton; (9) Gleitmittel, wie Talkum, Calciumstearat, Magnesiumstearat, feste Polyethylenglycole, Natriumlaurylsulfat und Mischungen davon; und (10) Farbstoffe.

Im Fall von Kapseln, Tabletten und Pillen können die pharmazeutischen Zusammensetzungen auch Puffermittel umfassen. Feste Zusammensetzungen von ähnlicher Art können auch als Füllstoffe in weichen und harten gefüllten Gelatine-Kapseln verwendet werden unter Verwendung solcher Exzipienten, wie Lactose oder Milchzucker, sowie von Polyethylenglykolen mit hohem Molekular-

NACHGEREICHT

gewicht, u. dgl..

Eine Tablette kann durch Pressen oder Formung, gegebenenfalls mit einem oder mehreren zusätzlichen Ingredienzien, hergestellt werden. Gepresste Tabletten können unter Verwendung von Bindemittel (beispielsweise Gelatine oder Hydroxypropylmethylcellulose), Gleitmittel, inertem Verdünnungsmittel, Konservierungsmittel, Zerfallsmittel (beispielsweise Natrium-Stärke-Glycolat oder vernetzte Natriumcarboxymethylcellulose), oberflächenaktivem oder Dispergierungsmittel hergestellt werden. Geformte Tabletten können durch Formen einer Mischung der pulverisierten Verbindung, die mit einem inerten flüssigen Verdünnungsmittel angefeuchtet ist, in einer geeigneten Maschine hergestellt werden. Die Tabletten und andere feste Dosierungsformen der pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, wie Dragees, Kapseln, Pillen und Granula, können gegebenenfalls gekerbt oder mit Überzügen und Schalen, wie enterischen Überzügen und anderen, auf dem Gebiet der Formulierung von Pharmazeutika wohl bekannten Überzügen hergestellt werden. Sie können auch so formuliert werden, dass eine langsame oder gesteuerte Freisetzung des darin vorhandenen aktiven Ingredienz vorgesehen wird, wobei z.B. Hydroxypropylmethylcellulose in unterschiedlichen Anteilen zum Vorsehen des gewünschten Freisetzungsprofils, andere Polymer-Matrizen, Liposome und/oder Mikrokügelchen verwendet werden. Sie können beispielsweise mittels Filtern durch einen Bakterien-zurückhaltenden Filter oder durch Einarbeiten von Sterilisierungsmitteln in Form steriler fester Zusammensetzungen, die in sterilem Wasser gelöst werden können, oder irgendein anderes steriles, injizierbares Medium unmittelbar vor der Verwendung sterilisiert werden. Diese Zusammensetzungen können gegebenenfalls auch undurchsichtig machende Mittel enthalten und können eine derartige Zusammensetzung haben, dass sie das (die) aktive(n) Ingredienz(ien) alleine, oder vorzugsweise in einem bestimmten Teil des Magendarmtrakts oder gegebenenfalls verzögert freisetzen. Beispiele für verwendbare Einbettungs-Zusammensetzungen inkludieren Polymersubstanzen und Wachse. Die Proteasen können mit einem oder mehreren der oben beschriebenen Exzipienten auch in mikroverkapselter Form vorliegen, wenn es geeignet ist. Flüssige Dosierungsformen zur oralen Verabreichung der Verbindungen der Erfindung inkludieren pharmazeutisch akzeptable Emulsionen, Mikroemulsionen, Lösungen, Sus-

pensionen, Sirups und Elixiere. Zusätzlich zum aktiven Ingredienz kann die flüssige Dosierungsform allgemein auf dem Gebiet verwendete inerte Verdünnungsmittel enthalten, wie z.B. Wasser oder andere Lösungsmittel, Lösungsvermittler und Emulgierungsmittel, wie Ethylalkohol, Isopropylalkohol, Ethylcarbonat, Ethylacetat, Benzylalkohol, Benzylbenzoat, Propylenglykol, 1,3-Butylenglykol, Öle (insbesondere Baumwollsaamen-, Erdnuss, Mais-, Keim-, Oliven, Rizinus- und Sesam-Öl), Glycerin, Polyethylenglycole und Fettsäureester von Sorbit, und Mischungen davon. Neben inertem Verdünnungsmitteln können die oralen Zusammensetzungen auch Adjuvantien, wie Netzmittel, Emulgierungs- und Suspendierungsmittel, Süßungsmittel, Geschmacksstoffe, Färbemittel, Parfümierungs- und Konservierungsmittel, inkludieren. Suspensionen können zusätzlich zu den aktiven Verbindungen Suspendierungsmittel, wie z.B. ethoxylierte Isostearylalkohole, Polyoxyethylensorbit und Sorbitanester, mikrokristalline Cellulose, Aluminiummetahydroxid, Bentonit, Agar-Agar und Tragant, und Mischungen davon enthalten.

Formulierungen der pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung zur rektalen oder vaginalen Verabreichung können als Zäpfchen vorliegen, welches durch Mischen der Proteasen der Erfindung mit einem oder mehreren geeigneten, irritationsfreien Exzipienten oder Trägern hergestellt werden, welche beispielsweise Kakaobutter, Polyethylenglycol, ein Suppositorien-Wachs oder ein Salicylat umfassen, welches bei Raumtemperatur fest, jedoch bei Körpertemperatur flüssig ist und daher im Rektum oder in der Vagina schmilzt und die aktive Verbindung freisetzt. Formulierungen der vorliegenden Erfindung, die zur vaginalen Verabreichung geeignet sind, inkludieren auch Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Spray-Formulierungen, die solche Träger enthalten, wie sie auf dem Gebiet als geeignet bekannt sind. Dosierungsformen zur topischen oder transdermalen Verabreichung einer Verbindung dieser Erfindung inkludieren Pulver, Sprays, Salben, Pasten, Cremes, Lotionen, Gele, Lösungen, Pflaster und Inhalationsmittel. Die Proteasen können unter sterilen Bedingungen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger gemischt werden, und mit jeglichen Konservierungsmitteln, Puffern oder Treibmitteln, die nötig sein können. Die Salben, Pasten, Cremes und Gele können zusätzlich zu einer aktiven Verbindung dieser Erfindung Exzipienten, wie tierische und

NACHGEREICHT

pflanzliche Fette, Öle, Wachse, Paraffine, Stärke, Tragant, Cellulosederivate, Polyethylenglycole, Silikone, Bentonite, Kieselsäure, Talkum und Zinkoxid oder Mischungen davon enthalten.

Pulver und Sprays können zusätzlich zu den Proteasen dieser Erfindung Exzipienten, wie Lactose, Talkum, Kieselsäure, Aluminiumhydroxid, Calciumsilikate und Polyamidpulver, oder Mischungen dieser Substanzen enthalten. Sprays können zusätzlich übliche Treibmittel, wie Fluorchlorkohlenwasserstoffe und flüchtige unsubstituierte Kohlenwasserstoffe, wie Butan und Propan, enthalten.

Transdermale Pflaster haben den zusätzlichen Vorteil, dass sie eine gesteuerte Abgabe der Proteasen der vorliegenden Erfindung an den Körper vorsehen. Solche Dosierungsformen können durch Auflösen oder Dispergieren der Proteasen im geeigneten Medium hergestellt werden. Absorptionsverbesserer können auch verwendet werden, um das Fließen der Proteasen über die Haut zu verstärken. Die Geschwindigkeit eines solchen Flusses kann entweder durch Vorsehen einer geschwindigkeitssteuernden Membran oder durch Dispergieren der Verbindung in einer Polymer-Matrix oder in einem Gel gesteuert werden.

Ophthalmische Formulierungen, Augensalben, Pulver, Lösungen u. dgl. werden auch als im Bereich dieser Erfindung liegend angesehen.

Pharmazeutische Zusammensetzungen dieser Erfindung, die zur parenteralen Verabreichung geeignet sind, umfassen die Proteasen der Erfindung in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen sterilen isotonischen wässrigen oder nicht-wässrigen Lösungen, Dispersionen, Suspensionen oder Emulsionen, oder sterile Pulver, die zu sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen direkt vor der Verwendung rekonstituiert werden können, welche Antioxidantien, Puffer, bakteriostatische Mittel, gelöste Substanzen, die die Formulierung mit dem Blut des beabsichtigten Empfängers isotonisch machen, oder Suspensions- oder Verdickungsmittel enthalten können. Zu den Beispielen für geeignete wässrige und nicht-wässrige Träger, die in den pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden können, zählen Wasser, Ethanol, Polyole (wie Glycerin, Propylenglykol, Polyethylenglykol u. dgl.) und geeignete Mischungen davon, Pflanzenöle, wie Olivenöl, und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat. Die richtige Fluidität kann beispielsweise durch

NACHGEREICHT

Verwendung von Überzugsmaterialien, wie Lecithin, durch das Aufrechterhalten der erforderlichen Partikelgröße im Fall von Dispersionen, und durch Verwendung von grenzflächenaktiven Mitteln erhalten bleiben. Diese Zusammensetzungen können auch Adjuvantien, wie Konservierungsmittel, Netzmittel, Emulgierungsmittel und Dispergierungsmittel enthalten. Das Verhindern der Einwirkung von Mikroorganismen auf die vorliegenden Zusammensetzungen kann durch den Einschluss verschiedener antibakterieller und antimykotischer Mittel, z.B. Paraben, Chlorbutanol, Phenolsorbinsäure u. dgl., gewährleistet werden. Es kann auch wünschenswert sein, isotonische Mittel, wie Zucker, Natriumchlorid u. dgl. in den Zusammensetzungen zu inkludieren. Außerdem kann eine längerfristige Absorption der injizierbaren pharmazeutischen Form durch das Einschließen von Mitteln, die die Absorption verzögern, wie Aluminiummonostearat und Gelatine, herbeigeführt werden. In einigen Fällen ist es zur Verlängerung der Wirkung eines Arzneimittels wünschenswert, die Absorption des Arzneimittels aus der subkutanen oder intramuskulären Injektion zu verlangsamen. Dies kann durch die Verwendung einer flüssigen Suspension von kristallinem oder amorphem Material mit schlechter Wasserlöslichkeit bewerkstelligt werden. Alternativ wird die verzögerte Absorption einer parenteral verabreichten Arzneimittelform durch Auflösen oder Suspendieren des Arzneimittels in einem Öl-Vehikel bewerkstelligt. Injizierbare Depot-Formen werden durch Bildung von mikroverkapselten Matrizen der vorliegenden Verbindungen in biologisch abbaubaren Polymeren, wie Polylactid-Polyglycolid, hergestellt. Je nach dem Verhältnis von Arzneimittel zu Polymer und der Art des bestimmten Polymers, das verwendet wird, kann die Geschwindigkeit der Arzneimittelfreisetzung gesteuert werden. Beispiele für andere biologisch abbaubare Polymere inkludieren Poly(orthoester) und Poly(anhydride).

Injizierbare Depot-Formulierungen werden auch hergestellt durch Einschließen des Arzneimittels in Liposomen oder Mikroemulsionen, die mit dem Körpergewebe kompatibel sind. Wenn die Proteasen der vorliegenden Erfindung als Pharmazeutika an Menschen und Tiere verabreicht werden, können sie an sich verabreicht werden oder als pharmazeutische Zusammensetzung, die beispielsweise 0,1 bis 99,5% (mehr bevorzugt 0,5 bis 90%) der Proteasen in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger enthalten. Die Präparate der vorliegenden Erfindung kön-

NACHGEREICHT

nen oral, parenteral, topisch oder rektal verabreicht werden. Sie werden natürlich in Formen, die für jeden Verabreichungsweg geeignet sind, gegeben. Beispielsweise werden sie in Tabletten- oder Kapselform, mittels Injektion, Inhalation, als Augenlotion, Salbe, Suppositorium usw. verabreicht, Verabreichung durch Injektion, Infusion oder Inhalation; topisch durch eine Lotion oder Salbe; und rektal durch Suppositorien. Die orale und die topische Verabreichung sind bevorzugt.

Die Ausdrücke „parenterale Verabreichung“ und „parenteral verabreicht“, wie hierin verwendet, bedeuten Verabreichungsarten, die keine enterale und topische Verabreichung sind, üblicherweise mittels Injektion, und inkludieren - ohne darauf eingeschränkt zu sein - intravenöse, intramuskuläre, intraarterielle, intrathekale, intrakapsuläre, intraorbitale, intracardiale, intradermale, intraperitoneale, transtracheale, subkutane, subkutikuläre, intraartikuläre, subkapsuläre, subarachnoidale, intraspinale und intrasternale Injektion und Infusion.

Das Medikament der vorliegenden Erfindung kann an Menschen und andere Tiere zur Therapie auf jedem geeigneten Verabreichungsweg verabreicht werden, einschließlich oral, nasal, wie z.B. als Spray, rektal, intravaginal, parenteral, intracisternal und topisch, wie mittels Pulver, Salben oder Tropfen, einschließlich bukkal und sublingual. Unabhängig vom gewählten Verabreichungsweg werden die Proteasen der vorliegenden Erfindung, die in einer geeigneten hydratisierten Form verwendet werden können, und/oder die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, mit herkömmlichen, dem Fachmann bekannten Methoden zu pharmazeutisch akzeptablen Dosierungsformen formuliert.

Die tatsächlichen Dosismengen der aktiven Ingredienzien in den pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung können variiert werden, um eine Menge des aktiven Ingredienz zu erhalten, die wirksam ist, um die gewünschte therapeutische Reaktion für einen bestimmten Patienten, eine Zusammensetzung und eine Verabreichungsart zu erreichen, ohne dass es für den Patienten toxisch ist. Die ausgewählte Dosismenge hängt von vielerlei Faktoren ab, einschließlich der Aktivität der bestimmten Protease der vorliegenden Erfindung, die verwendet wird, dem Verabreichungsweg, der Verabreichungszeit, der Ausscheidungsrate der be-

stimmten Verbindung, die verwendet wird, der Behandlungsdauer, anderen Arzneimitteln, Verbindungen und/oder Materialien, die in Kombination mit den verwendeten Proteasen verwendet werden, dem Alter, Geschlecht, Gewicht, Zustand, der allgemeinen Gesundheit und der früheren Krankengeschichte des behandelten Patienten und dgl. Faktoren, die auf dem Gebiet der Medizin wohl bekannt sind. Ein Arzt oder ein Tierarzt mit üblichem Fachkönnen kann die benötigte wirksame Menge der pharmazeutischen Zusammensetzung leicht bestimmen und vorschreiben. Beispielsweise könnte der Arzt oder Tierarzt mit einer Dosis der in der pharmazeutischen Verbindung verwendeten Proteasen der Erfindung beginnen, die niedriger als jene ist, die zur Erzielung der gewünschten therapeutischen Wirkung erforderlich ist, und die Dosierung allmählich bis zum Erreichen der gewünschten Wirkung erhöhen.

Obgleich die Proteasen der vorliegenden Erfindung alleine verabreicht werden können, ist eine Verabreichung der Proteasen als pharmazeutische Formulierung (Zusammensetzung) bevorzugt.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Medikament weiters mindestens ein weiteres aktives Ingredienz.

Dieses aktive Ingredienz kann jedes sein, das die Prävention und die Behandlung von angiogenen Erkrankungen mit den Proteasen gemäß der vorliegenden Erfindung unterstützt. Es ist jedoch natürlich auch möglich, aktive Ingredienzien, die andere Wirkungen als diese Proteasen zeigen, hinzuzufügen.

Das mindestens eine weitere aktive Ingredienz ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Flavonoiden, insbesondere Bioflavonoiden, Antioxidantien oder anderen Substanzen, wie Silberweidenrindenextrakt.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Medikament mindestens eine (zwei, drei oder sogar vier) Protease(n) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bromelain, Papain, Ficin, Nattokinase, Brinase, Serapeptase, Reptilase, Elastase lumbrokinase, Cucumistin, Subtilisin, Seaprose und gegebenenfalls ein weiteres aktives Ingredienz, wobei das weitere aktive Ingredienz vorzugsweise ein Flavonoid, insbesondere Rutin, ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Flavonoid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Rutin oder Derivaten davon.

NACHGEREICHT

Bromelain und Papain werden beispielsweise als Thiol-Proteasen bezeichnet und enthalten einen Cystein-Rest an der aktiven Stelle. Unter oxidierenden Bedingungen verliert die Thiol-Gruppe dieses Cysteins ein Wasserstoffatom und kann mit einer anderen Thiol-Gruppe vernetzen, wobei es eine Disulfidbrücke bildet, oder alternativ mit einem anderen Rest durch denselben oxidativen Prozess vernetzt. In diesem oxidierten Zustand verlieren Bromelain und Papain an Wirksamkeit. Durch den Einschluss des Antioxidans Vitamin C, Bioflavonoiden wie Rutin und Proanthocyanidinen kann die Oxidation der aktiven Sulfhydryl-Gruppe der Thiol-Proteasen verhindert werden.

Dieses weitere aktive Ingredienz ist vorzugsweise im Medikament der vorliegenden Erfindung in einer Menge von 5 bis 35% Gew./Gew., vorzugsweise 10 bis 30% Gew./Gew., mehr bevorzugt 15 bis 25% Gew./Gew. enthalten.

Die vorliegende Erfindung ist durch die folgenden Figuren und Beispiele weiter veranschaulicht.

Fig. 1 zeigt die LDH-Freisetzung in den Überstand von mit Enzym behandelten HUVEC.

Fig. 2 zeigt einen MTT-Test mit mit Enzym behandelten HUVEC.

Fig. 3 zeigt die Ergebnisse eines Röhrchenbildungs-Tests: (A) mit Enzym behandelte Probe; (B) mit VEGF behandelte Kontrolle.

Fig. 4 zeigt die VEGF-Konzentrationen im Blut von mit Rutosid behandelten Patienten.

Fig. 5 zeigt einen MTT-Test mit mit VEGF stimuliertem HUVEC und Rutosid. Keine Inhibition der Proliferation ist zu sehen.

Fig. 6 zeigt die toxischen Auswirkungen von Rutosid auf HUVEC. Keine toxischen Auswirkungen waren in ruhenden HUVEC sichtbar, wogegen mit VEGF aktivierte HUVEC eine geringe Auswirkung zeigt.

BEISPIELE:

Materialien:

Bromelain aus dem Strunk der Ananas mit einer Aktivität von 3,51 E/mg wurde von Sigma Aldrich, Österreich, erhalten.

Nattokinase mit einer Aktivität von 10.000 E/ml wurde von Japan Bio Science Laboratory Co., Ltd., käuflich erworben.

Papain aus Carica Papaya mit einer Aktivität von > 3E/mg wurde von Sigma Aldrich, Österreich, erhalten.

Beispiel 1: Toxizitäts-Test

Die antiproliferative Aktivität von Bromelain, Nattokinase und Papain wurde unter Verwendung eines Lactat Dehydrogenase (LDH)-Tests beurteilt. Menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) aus semikonfluenten Kulturen wurden durch Behandlung mit Trypsin geerntet, und mit einer Dichte von 2500 Zellen/Vertiefung in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen geimpft, die zuvor mit humanem Fibronectin beschichtet worden waren. Um ein ordentliches Anhaften zu ermöglichen, wurden die Zellen 24 Stunden lang in Endothelial Basal Medium 2MV (Cambrex Biochemicals), enthaltend 10% fötales Kälberserum, 60 µg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, Ascorbinsäure und Heparin, inkubiert. Nach dem Anhaften wurden die Zellen durch Inkubation bei 37°C/95% Luftfeuchtigkeit in Medium 199 + 10% fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) ohne Wachstumsfaktoren ausgehungert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand durch Medium 199, das 10% FCS, VEGF und unterschiedliche Konzentrationen der Enzyme enthielt, ersetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurde der Überstand geerntet, und ein LDH-Test wurde gemäß den Instruktionen des Herstellers (Promega, Deutschland) durchgeführt: 50 µl Aliquots aus allen Vertiefungen wurden in eine frische (Enzym-Test)-Platte mit 96 Vertiefungen und flachem Boden transferiert. Der Test-Puffer wurde in die Substrat-Mischung zugegeben und sanft gemischt. 50 µl rekonstituierte Substrat-Mischung wurden in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. 50 µl Stop Solution wurden in jede Vertiefung zugegeben. Innerhalb von einer Stunde wurde die optische Dichte bei 490 nm mit einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Ergebnisse sind als % unbehandelte Kontrolle ausgedrückt.

Die Ergebnisse sind in Fig. 1 veranschaulicht. Sie zeigen eindeutig, dass Bromelain, Nattokinase und Papain bis zu einer Menge von einschließlich 25 µg/ml nach zweitägiger Inkubation keine toxischen Auswirkungen auf HUVEC zeigten.

Beispiel 2: Antiproliferative Aktivität

Die antiproliferative Aktivität von Bromelain, Nattokinase und Papain und ihren Mischungen wurde unter Verwendung eines 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbormid (MTT)-Tests beurteilt. Menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen

NACHGEREICHT

(HUVEC) aus semikonfluenten Kulturen wurden durch Behandlung mit Trypsin geerntet, mit einer Dichte von 1000 Zellen/Vertiefung in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen geimpft, die zuvor mit humanem Fibronectin beschichtet worden waren. Um ein ordentliches Anhaften zu ermöglichen, wurden die Zellen 24 Stunden lang in Endothelial Basal Medium 2MV (Cambrex Biochemicals), enthaltend 10% fötales Kälberserum, 60 µg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, hrEGF, hrFGF2, hrIGF, hrVEGF, Ascorbinsäure und Heparin, inkubiert. Nach dem Anhaften wurden die Zellen durch Inkubation bei 37°C/95% Luftfeuchtigkeit in Medium 199 + 10% fötales Kälberserum (FCS) ohne Wachstumsfaktoren ausgehungert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand durch Medium 199, das 10% FCS und unterschiedliche Konzentrationen von Bromelain, Nattokinase und Papain enthielt, ersetzt. Die Zellen wurden weitere 48 Stunden lang bei 37°C/95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der MTT-Test wurde unter Verwendung eines EZ4U MTT Kit (Biomedica, Österreich; gemäß den Instruktionen des Herstellers) durchgeführt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm mit einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Ergebnisse sind als % Proliferation ausgedrückt, wobei 100% die Proliferation der mit VEGF behandelten Kontrolle ist.

Die Ergebnisse des Konzentrations-Reaktions-Experiments sind in Fig. 2 veranschaulicht. Sie zeigen eine deutliche antiproliferative Auswirkung von Bromelain, Nattokinase und Papain, wobei Bromelain und Papain 75% Wachstum bei Konzentrationen von selbst lediglich 25 µg/ml erreichen. Zusammengenommen mit den Ergebnissen aus dem LDH-Freisetzungstest weisen diese Daten auf eine deutliche antiproliferative, jedoch nicht zytotoxische Aktivität hin.

Die Ergebnisse der Mischungen sind in Tabelle 1 gezeigt. Eine deutliche antiproliferative Wirkung ist sichtbar.

Tabelle 1: Wachstumsinhibition von HUVEC bei Kombinationen von Bromelain-Nattokinase und Papain in Gegenwart von VEGF.

| Bromelain | Nattokinase | Papain | %Proliferation |
|------------------|--------------------|---------------|-----------------------|
| 0,00% | 0,00% | 100,00% | 75,45% |
| 75,00% | 0,00% | 25,00% | 89,09% |
| 16,67% | 16,67% | 66,67% | 91,82% |

NACHGEREICHT

| Bromelain | Nattokinase | Papain | %Proliferation |
|------------------|--------------------|---------------|-----------------------|
| 25,00% | 75,00% | 0,00% | 94,55% |
| 66,67% | 16,67% | 16,67% | 96,82% |

Beispiel 3: Antiangiogene Aktivität

Die antiangiogene Aktivität wurde unter Verwendung eines Röhrenbildungs-Tests beurteilt. Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel (Becton Dickinson, Wien) wurde bei einer Temperatur um 4°C aufgetaut. 50 µl pro Vertiefung wurden in die Vertiefungen einer Mikroplatte mit 96 Vertiefungen mit der Pipette aufgetragen. Die Platte wurde 24 Stunden lang bei 4°C belassen. Vor dem Experiment wurde die Platte 30-60 Minuten lang bei 37°C inkubiert, um das Gel zu verfestigen. HUVEC wurden 24 Stunden lang mit Medium 199, das 2% FCS enthielt, inkubiert. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin geerntet und in mit Matrigel beschichtete Mikroplatten mit 96 Vertiefungen mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Vertiefung geimpft. Arzneimittel und VEGF wurden bis zu den gewünschten Konzentrationen zugegeben. Nach weiteren 6 Stunden wurden die Vertiefungen photographiert. Die Gesamtlänge der Röhren wurde unter Verwendung der ImageJ Software bestimmt, wobei sie mittels des Neuron Length Determination Plugin gemessen wurden.

Bromelain, Nattokinase und Papain

Die Ergebnisse des Röhrenbildungs-Tests der Mischungen sind in Fig. 3 sowie in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: % Röhrenbildung in HUVEC in Gegenwart von VEGF. Die Ergebnisse sind als % Röhrenbildung gezeigt, wobei 100% gleich der Röhrenbildung in nur mit VEGF behandelten Proben gleich ist.

| Bromelain | Nattokinase | Papain | % Röhrenbildung |
|------------------|--------------------|---------------|------------------------|
| 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% |

| Bromelain | Nattokinase | Papain | % Röhrrchenbildung |
|------------------|--------------------|---------------|---------------------------|
| 75,00% | 0,00% | 25,00% | 13,66% |
| 25,00% | 0,00% | 75,00% | 16,23% |
| 16,67% | 66,67% | 16,67% | 16,35% |
| 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% |
| 50,00% | 25,00% | 25,00% | 52,22% |
| 0,00% | 0,00% | 100,00% | 60,14% |
| 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100% |

Fig. 3 (A) zeigt die Kombination aus 25% Bromelain, 50% Nattokinase und 25% Papain. (B) zeigt die mit VEGF behandelte Kontrolle. Während in der VEGF-Kontrolle ein enges Muster von gebildeten Röhrrchen sichtbar ist (Pfeile), zeigt die mit Enzym behandelte Probe große Flächen ohne Röhrrchenbildung, was auf eine antiangiogene Aktivität des Enzym-Cocktails hinweist.

Tabelle 2 zeigt die Röhrrchen-Längen, ausgedrückt als % Röhrrchenbildung. Die Ergebnisse zeigen deutlich:

1. Die Röhrrchenbildung wird durch Mischungen von Bromelain, Nattokinase und Papain inhibiert;
2. Die Kombination von Bromelain, Nattokinase und Papain hat eine größere Wirkung als die Arzneimittel alleine.

Proteasen aus Tieren

Um zu testen, ob die Röhrrchenbildung wegen einer Zell-Loslösung inhibiert wird, wurden HUVEC mit Chymotrypsin und Trypsin behandelt, zwei proteolytischen Enzymen, die bei der Zell-Loslösung in weit verbreiteter Verwendung sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt. Weder Chymotrypsin, noch Trypsin zeigten eine signifikante Wirkung.

Tabelle 3: % Röhrrchenbildung bei HUVEC nach Behandlung mit VEGF und Trypsin oder Chymotrypsin.

| Konzentration [µg/ml] | Chymotrypsin | Trypsin |
|----------------------------------|---------------------|----------------|
| 0 | 100,00% | 100,00% |
| 2,5 | 112,40% | 112,82% |
| 5 | 95,94% | 112,23% |
| 10 | 81,16% | 95,22% |
| 20 | 131,18% | 127,87% |

Eine signifikante Verringerung der Proliferation wurde in humanen Nabelschnur-Endothelzellen nach Behandlung mit Bromelain, Nattokinase und Papain alleine oder in Kombination, bei Konzentrationsbereichen zwischen 25 und 100 µg/ml nachgewiesen.

Eine relativ geringe Toxizität von Bromelain, Nattokinase und Papain wurde bewiesen, insbesondere bei jenen Mengen, bei welchen gezeigt wurde, dass sie eine antiproliferative Wirkung aufweisen. Konzentrationen von bis zu 50 µg/ml zeigten keine toxische Wirkung auf HUVEC nach zweitägiger Inkubation bei 37°C.

Eine signifikante Verringerung der durch VEGF vermittelten Bildung von mikrogefäßartigen Röhrrchen, wurde nach Behandlung mit Bromelain, Nattokinase und Papain alleine, sowie nach Behandlung mit Kombinationen dieser Enzyme nachgewiesen.

Beispiel 4:

In diesem Beispiel wurde die Auswirkung einer Enzymtherapie (Rutozym: Nattokinase, Bromelain, Papain + Rutin-Bioflavonoid, Silberweidenrindenextrakt) auf die Menge der VEGF-Konzentration im Blut untersucht. Es konnte gezeigt werden (siehe nachstehende Ergebnisse), dass die Enzymtherapie eine erhöhte VEGF-Konzentration im menschlichen Blut signifikant reduziert.

Der Versuch wurde als randomisierte, offene („open label“)-Multizentrum-Pilot-Studie an 111 Diabetes-Typ 2-Patienten beiderlei Geschlechts in zwei parallelen, vergleichbaren Gruppen durchgeführt. 54 Patienten erhielten vier Wochen lang Rutozym™ (Nattokinase (20.000 FU/gm), 25 mg Bromelain (2450 GDU/gm), 90 mg Papain N.F. (2.400 USP-Einheiten/mg).100 mg Rutin-Bioflavonoid-Komplex (Rutoside und Rutinoside) 120 mg Silberweidenrin-

denextrakt (15% Salicin/7% Polyphenole) 100 mg Marlyn Nutraceuticals, USA). Die VEGF-Konzentrationen im Plasma der Patienten wurden vor der Supplementierung und direkt nach 4 Wochen Supplementierung getestet. Die Patienten dienten sich selbst mit ihren anfänglichen Werten als Eigenkontrolle.

Die VEGF-Konzentrationen im Blut wurden in 4 verschiedene Gruppen unterteilt (Quartile; vgl. Fig. 4): VEGF-Konzentration im Patienten-Blut vor der Therapie < 50 ng/ml (s50 = Start < 50 ng/ml; e50 = Ende) s100: VEGF-Konzentration < 100 ng/ml vor der Therapie; s200: < 200 ng/ml vor der Therapie, und s300: > 200 ng VEGF vor der Therapie. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines Medikaments gemäß der vorliegenden Erfindung, welches Proteasen aus pflanzlichen und/oder mikrobiellen Quellen umfasst, verwendet werden kann, um die VEGF-Menge im Blut zu verringern und somit zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer Neoangiogenese verbunden sind, verwendet werden können.

Beispiel 5: Antiproliferative Auswirkungen von Rutosid auf HUVEC

Um eine mögliche antiproliferative Aktivität von Rutosid zu beurteilen, wurde ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test verwendet. Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) aus semikonfluenten Kulturen wurden durch Behandlung mit Trypsin geerntet, und mit einer Dichte von 1000 Zellen/Vertiefung in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen geimpft, welche zuvor mit humanem Fibronectin beschichtet worden waren. Um ein ordentliches Anhaften zu ermöglichen, wurden die Zellen 24 Stunden lang in Endothelial Basal Medium 2MV (Cambrex Biochemicals), enthaltend 10% fötales Kälberserum, 60 µg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, hrEGF, hrFGF-2, hrIGF, hrVEGF, Ascorbinsäure und Heparin, inkubiert. Nach dem Anhaften wurden die Zellen durch Inkubation bei 37°C/95% Luftfeuchtigkeit in Medium 199 + 10% fötales Kälberserum (FCS) ohne Wachstumsfaktoren ausgehungert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand durch Medium 199, das 10% FCS und unterschiedliche Konzentrationen von Rutosid und VEGF enthielt, ersetzt. Die Zellen wurden weitere 48 Stunden lang bei 37°C/95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der MTT-Test wurde unter Verwendung eines EZ4U MTT Kit (Biomedica, Österreich) gemäß den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm mit einer Referenz-Wellen-

länge von 620 nm gemessen. Die Ergebnisse sind als % Proliferation ausgedrückt, wobei 100% die Proliferation der mit VEGF behandelten Kontrolle ist.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Rutosid die mit VEGF stimulierte Proliferation von HUVEC nicht inhibiert (vgl. Fig. 5).

Beispiel 6: Toxische Auswirkungen von Rutosid auf HUVEC

Um eine mögliche zytotoxische Aktivität von Rutosid zu testen, wurde ein Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Test verwendet. Menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) aus semikonfluenten Kulturen wurden durch Behandlung mit Trypsin geerntet, und mit einer Dichte von 2500 Zellen/Vertiefung in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen geimpft, die zuvor mit humanem Fibronectin beschichtet worden waren. Um ein ordentliches Anhaften zu ermöglichen, wurden die Zellen 24 Stunden lang in Endothelial Basal Medium 2MV (Cambrex Biochemicals), enthaltend 10% fötales Kälberserum, 60 µg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, hrEGF, hrFGF-2, hrIGF, hrVEGF, Ascorbinsäure und Heparin, inkubiert. Nach dem Anhaften wurden die Zellen durch Inkubation bei 37°C/95% Luftfeuchtigkeit in Medium 199 + 10% fötales Kälberserum (FCS) ohne Wachstumsfaktoren ausgehungert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand durch Medium 199, das 10% FCS, VEGF und unterschiedliche Konzentrationen der Enzyme enthielt, ersetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurde der Überstand geerntet, und ein LDH-Test wurde gemäß den Instruktionen des Herstellers (Promega, Deutschland) durchgeführt: 50 µl Aliquots aus allen Vertiefungen wurden in eine frische (Enzym-Test)-Platte mit 96 Vertiefungen und flachem Boden transferiert. Der Test-Puffer wurde der Substrat-Mischung zugegeben und vorsichtig gemischt. 50 µl rekonstituierte Substrat-Mischung wurden in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. 50 µl Stop Solution wurden in jede Vertiefung zugegeben. Innerhalb von einer Stunde wurde die optische Dichte bei 490 nm mit einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Ergebnisse sind als % unbehandelte Kontrolle ausgedrückt.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Toxizität von Rutosid bei HUVEC vernachlässigbar ist (vgl. Fig. 6).

Patentansprüche:

1. Verwendung mindestens einer Protease zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prävention von Augenkrankheiten.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Augenkrankheiten mit einer Neoangiogenese verbundene Augenkrankheiten sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Augenkrankheit ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Adamantiadis-Behcet-Syndrom, altersbezogener Makuladegeneration (AMD), choroidaler Neovaskularisation, diabetischer Retinopathie, hypertoner Retinopathie, von-Hippel-Lindau-Syndrom, idiopathischer polypoidaler choroidaler Vaskulopathie, idiopathischer okulärer Neovaskularisation, Iris-Neovaskularisation, ischämischer proliferativer Retinopathie, Neovaskularisation der Hornhaut, neovaskulärem Glaukom, proliferativer Sichelzellen-Retinopathie, proliferativer Vitreoretinopathie (PVR), retinaler angiomatöser Proliferation (RAP) und retrolentaler Fibroplasie.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Protease ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus pflanzlichen, tierischen und mikrobiellen Proteasen.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine pflanzliche Protease ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Bromelain, Papain, Ficin und Cucumisin.
6. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mikrobielle Protease ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Nattokinase, Brinase, Seaprose und Subtilisin.
7. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die tierische Protease ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Serrapeptase, Reptilase, Elastase und Lumbrokinase.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch ge-

kennzeichnet, dass die mindestens eine pflanzliche, tierische und/oder mikrobielle Protease im Medikament in einer Menge von 10 bis 90% Gew./Gew., vorzugsweise von 20 bis 80% Gew./Gew., mehr bevorzugt von 30 bis 70% Gew./Gew. enthalten ist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine pflanzliche, tierische und/oder mikrobielle Protease einem Individuum in einer Menge von 1 bis 100 mg/kg, vorzugsweise 2 bis 50 mg/kg, mehr bevorzugt 5 bis 20 mg/kg Körpergewicht verabreicht wird.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament weiters mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, ein Verdünnungsmittel und/oder einen Exzipienten, vorzugsweise ein Bindemittel, ein Füllmittel, ein Zerfallsmittel, ein Gleitmittel, ein Konservierungsmittel und/oder einen Überzug aufweist.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur intraokularen, oralen, topischen, enteralen oder parenteralen Verabreichung ausgelegt ist.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament in einer pharmazeutischen Form, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Augentropfen, Ohrentropfen, Nasentropfen, Nasenspray, Tabletten, vorzugsweise löslichen Tabletten, Brausetabletten, Magensaft-resistenten Tabletten und Sublingual-Tabletten, Kapseln, vorzugsweise Magensaft-resistenten Kapseln, Pulvern, Granula, oralen Flüssigkeiten, oralen Tropfen, Salben, Lotionen, Emulsionen, Hydrogelen, Suppositorien, Pessaren, Infusionen und Injektionen vorgesehen ist.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament weiters mindestens ein weiteres aktives Ingredienz aufweist.

14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine weitere aktive Ingredienz ein Flavonoid

NACHGEREICHT

und/oder ein Antioxidans ist.

15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Flavonoid Rutin ist.

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere aktive Ingredienz im Medikament in einer Menge von 5 bis 35% Gew./Gew., vorzugsweise 10 bis 30% Gew./Gew., mehr bevorzugt 15 bis 25% Gew./Gew. enthalten ist.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament mindestens eine Protease ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bromelain, Papain, Ficin, Nattokinase, Brinase, Serrapeptase, Reptilase, Elastase, Lumbrokinase, Cucumistin, Subtilisin, Seaprose und gegebenenfalls ein weiteres aktives Ingredienz umfasst, wobei das weitere aktive Ingredienz vorzugsweise ein Flavonoid, insbesondere Rutin, ist.

NACHGEREICHT

1/4

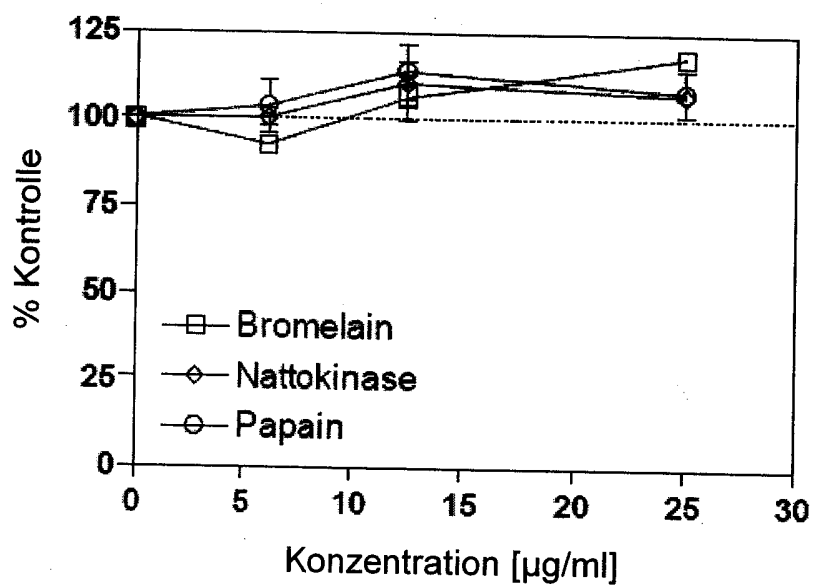


Fig. 1

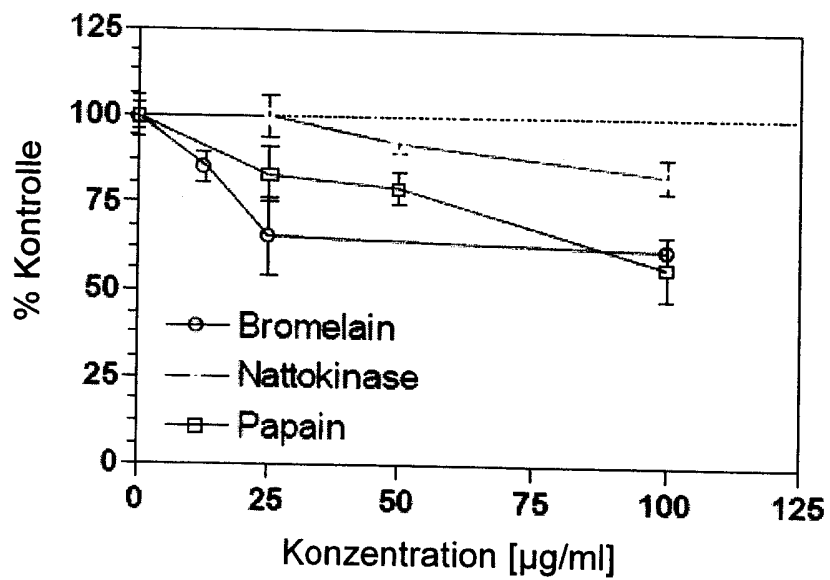


Fig. 2



Fig. 3

3/4

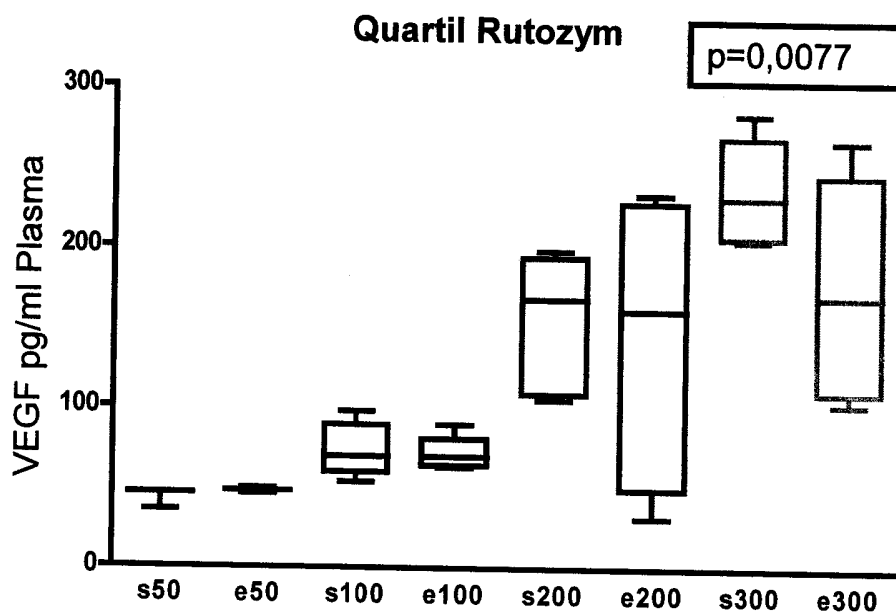


Fig. 4

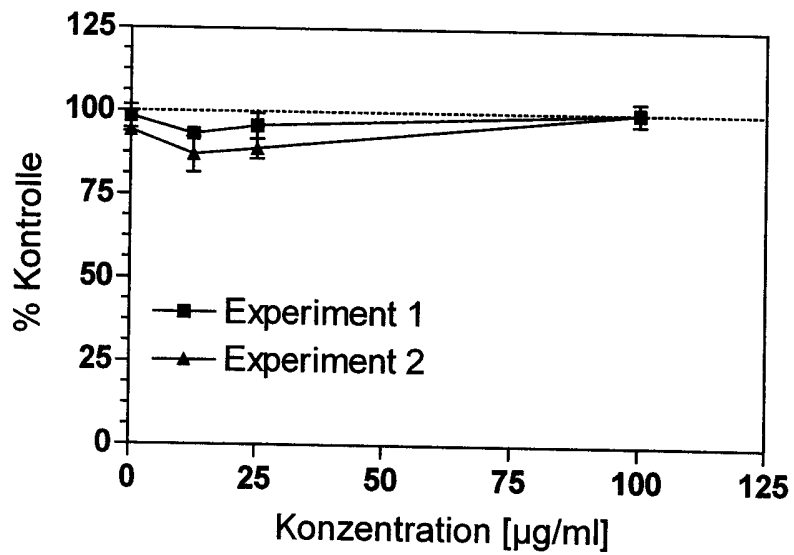


Fig. 5

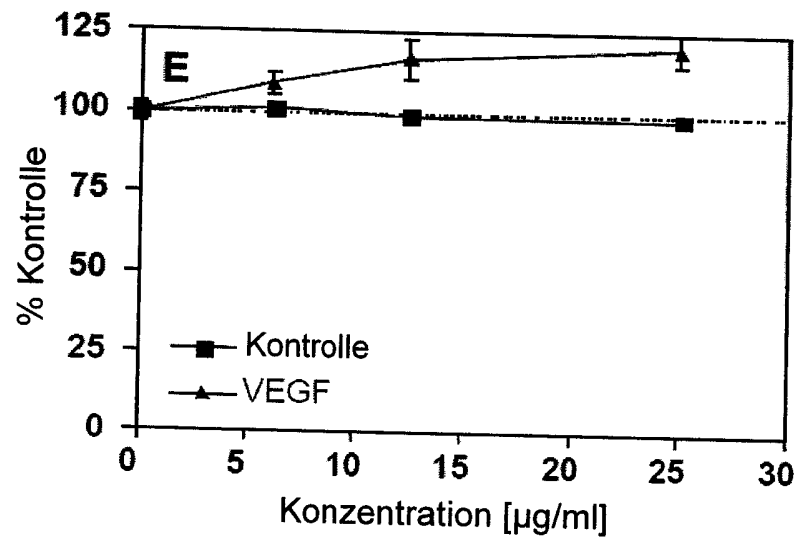


Fig. 6



| Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC ⁸ : A61K 38/48 (2006.01); A61K 31/7048 (2006.01); A61P 27/02 (2006.01) | | |
|---|--|--|
| Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß ECLA: A61K 38/48, A61K38/48L, A61K 31/7048 | | |
| Recherchiertes Prüfverfahren (Klassifikation): A61K, A61P | | |
| Konsultierte Online-Datenbank: Fulltext, Medline, WPI | | |
| Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 27. November 2006 eingereichten Ansprüchen 1, 3-17 erstellt. | | |
| Kategorie ⁷⁾ | Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich | Betreffend Anspruch |
| X | WO 2005/110453 A2 (CATALYST BIOSCIENCES) 24. November 2005 (24.11.2005) <i>Ansprüche 1, 15, 16</i> | 1, 3-17 |
| | -- | |
| X | JP 60112720 A (KOSAKA R) 19. Juni 1985 (19.06.1985) (abstract) WPI [online] [heruntergeladen am 07.05.2007] <i>WPI-Zusammenfassung</i> | 1, 3, 5 |
| | -- | |
| X | WO 2004/046199 A2 (SOCIETE LA BIOCHIMIE APPLIQUEE SA) 3. Juni 2004 (03.06.2004) (abstract) WPI [online] [heruntergeladen am 07.05.2007] <i>Titel der WPI Zusammenfassung</i> | 1 |
| | -- | |
| X | WO 2005/056784 A1 (JAPAN SCI & TECHNOLOGY AGENCY) 23. Juni 2005 (23.06.2005) (abstract) WPI [online] [heruntergeladen am 07.05.2007] <i>WPI-Zusammenfassung</i> | 1, 3, 6 |
| | -- | |
| X | SU 1342500 A (OMSK MED INST) 7. Oktober 1987 (07.10.1987) (abstract) WPI [online] [heruntergeladen am 07.05.2007] <i>WPI-Zusammenfassung</i> | 1, 3, 5 |
| Datum der Beendigung der Recherche: 7. Mai 2007 | | <input checked="" type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Mag. MOSSER |
| ⁷⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: | | |
| X | Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. | A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. |
| Y | Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. | P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. |
| | | E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). |
| | | & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist. |

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich | Betreffend Anspruch |
|-----------|---|---------------------|
| Y | DE 19724458 A1 (MUCOS PHARMA GMBH) 24. Dezember 1998 (24.12.1998) <i>Ansprüche 1, 3</i> | 14, 17 |
| Y | US 6103756 A (GORSEK) 15. August 2000 (15.08.2000) <i>Anspruch 1</i> -- Der Anspruch 2 wurde mangels technischer Merkmale nicht recherchiert. --- | 14, 17 |