

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 219**

51 Int. Cl.:
A61K 38/48 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09007129 .1**
96 Fecha de presentación: **28.05.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2130551**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2009**

54 Título: **Purificación mejorada de colagenasas a partir de un cultivo líquido de Clostridium histolyticum**

30 Prioridad:
02.06.2008 EP 08010019

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2012

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**Eckstein, Hellmut;
Fischer, Michaela;
Hoelke, Werner;
Liehre, Antje;
Suppmann, Bernhard y
Thalhofer, Johann-Peter**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 388 219 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Purificación mejorada de colagenasas a partir de un cultivo líquido de *Clostridium histolyticum*

5 La presente invención pertenece al ámbito de la bioquímica de proteínas y se refiere a métodos para obtener las enzimas colagenasas I y II purificadas de *C. histolyticum*. Una ventaja técnica especial de la invención consiste en la mejora de la separación rápida de las enzimas deseadas de las actividades proteolíticas concomitantes, en particular de la proteasa clostripaína. Cuando se realiza la purificación con arreglo a la presente invención, las colagenasas son especialmente apropiadas como ingredientes de mezclas de proteasas para la disociación de tejidos.

10 La presente invención proporciona un método de purificación de las proteínas de las colagenasas de tipo I y de tipo II del *Clostridium histolyticum* a partir de una mezcla compleja realizando sucesivamente (a) la precipitación con sulfato amónico, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía aniónica. Se facilitan las condiciones que conducen a una preparación purificada y parcialmente estabilizada, incluso después del paso de la precipitación. El método de la invención conduce a la eliminación rápida y eficaz de otras actividades proteolíticas. Las preparaciones según la invención proporcionan las proteínas colagenasa de tipo I y de tipo II excepcionalmente puras e intactas, que son enzimáticamente activas. La invención proporciona también mezclas de las dos proteínas aisladas. La invención proporciona además el uso de proteínas de colagenasas purificadas o mezclas de las mismas para tratar una muestra de tejido "in vitro".

20 Antecedentes de la invención

25 Las colagenasas microbianas (EC 3.4.24.3) son metaloproteinasas que degradan las regiones helicoidales del colágeno nativo, reduciéndolas a fragmentos pequeños. El punto de rotura preferido es el -Gly de la secuencia -Pro-Xaa-Gly-Pro-. Se han aislado seis formas principales, agrupadas en dos clases, del *Clostridium histolyticum* que tienen una reactividad inmunológica cruzada, pero que tienen diferentes secuencias y diferentes especificidades. Se han aislado otras variantes a partir del *Bacillus cereus*, *Empedobacter collagenolyticum*, *Pseudomonas marinoglutinos*a, y de especies de *Vibrio* y *Streptomyces*.

30 Las colagenasas intervienen en la destrucción de las estructuras extracelulares en la patogénesis de bacterias del tipo *Clostridium histolyticum*. Por consiguiente son exotoxinas y actúan como factores de virulencia, p.ej. facilitando la propagación de gangrena gaseosa.

35 Las colagenasas se dirigen normalmente al tejido conjuntivo de las células musculares y de otros órganos. Debido a su potente actividad hidrolítica del tejido conjuntivo, las colagenasas y otras proteinasas, por ejemplo la termolisina, se emplean para la disociación de tejidos "in vitro".

40 Las colagenasas producidas por el *Clostridium histolyticum* fueron las primeras colagenasas que se descubrieron y caracterizaron. El líquido filtrado del cultivo de *Clostridium histolyticum* contiene una mezcla de colagenasas y otras proteinasas.

45 Se han purificado hasta la homogeneidad seis colagenasas principales que tienen pesos moleculares comprendidos entre 68 y 130 kDa y se han denominado colagenasas de tipo I y de tipo II (ambos grupos de proteínas se denominan también en este escrito colectivamente "proteínas de colagenasas"). Dichas colagenasas clostridianas contienen aproximadamente un átomo de cinc por cadena proteica, dicho átomo de cinc parece ser esencial con vistas a la actividad enzimática.

50 A escala industrial se han aislado las colagenasas clostridianas del líquido filtrado del cultivo de *Clostridium histolyticum*. Las preparaciones en bruto contienen las colagenasas y también un pigmento marrón, la clostripaína (clostridiopeptidasa B), una aminopeptidasa y varias proteinasas neutras. Las preparaciones en bruto pueden servir para la purificación de las colagenasas individuales de tipo I y II, pero el trabajo de purificación es muy largo.

55 La presencia de la cisteína-proteasa clostripaína en la mezcla plantea un problema técnico importante, porque esta peptidasa hidroliza progresivamente las colagenasas. A este respecto, la colagenasa de tipo I parece ser más sensible al ataque proteolítico de la clostripaína que la colagenasa de tipo II. Cuando se purifican las colagenasas del líquido filtrado del cultivo o del líquido sobrenadante del cultivo de *C. histolyticum* es deseable separar la clostripaína en un paso temprano para minimizar las pérdidas.

60 Bond, M.D., Van Wart, H.E., (Biochemistry 23, 3077-3085, 1984) describen un esquema de purificación basado en la cromatografía, que se inicia con una preparación enzimática en bruto. En el primer paso se cromatografía la enzima en bruto a través de hidroxilapatita. El mecanismo de la cromatografía de la hidroxilapatita se conoce también como intercambio iónico en "modo mixto". Incluye interacciones inespecíficas entre iones calcio cargados positivamente e iones fosfato cargados negativamente de la fase estacionaria de resina de hidroxilapatita con grupos carboxilo de proteína cargados negativamente y grupos amino cargados positivamente. Para la elución se emplea normalmente

un tampón que tiene una concentración creciente de fosfato. Según Bond, M.D., Van Wart, H.E. (lugar citado) se eluyen tres fracciones con un gradiente de fosfato potásico. La primera fracción contiene la mayor parte del pigmento y la tercera fracción contiene el 95% de la actividad de la colagenasa. La tercera fracción se somete además a cromatografía de filtración a través de gel en una columna Sephacryl™ S200, y después por cromatografía de afinidad a través de L-arginina-AffiGel™ 202. Se combinan estos pasos y en el orden indicado sirven para separar el pigmento marrón y la mayor parte de las proteinasas contaminantes activas contra la caseína, el éster de etilo de la benzoil-L-arginina y la elastina. Por cromatografía con ligando de colorante rojo reactivo llamado Reactive Red™ 120 se subdividen las colagenasas de tipo I y de tipo II.

En WO 2003/004628 se describe un esquema de purificación en el que el líquido sobrenadante del cultivo de *C. histolyticum* se cromatografía sucesivamente a través de (1) hidroxilapatita, (2) una resina de intercambio aniónico y (3) una resina de intercambio catiónico. La tercera fracción que se eluye de la columna de la hidroxilapatita contiene la fracción I/II de las colagenasas pero también contiene la clostripaína. Se eluye la resina de intercambio aniónico para separar las dos fracciones de colagenasa I y colagenasa II. Sin embargo, ambas fracciones siguen conteniendo clostripaína. Las colagenasas se separan de la clostripaína con una resina de intercambio catiónico. Los métodos recién descritos constituyen distintas estrategias cromatográficas, cuya finalidad es eliminar la clostripaína molesta de las colagenasas.

En WO 2007/089851 se describe la evaluación de la precipitación con sulfato amónico como paso primario de recuperación de las proteínas de colagenasas a partir del líquido filtrado de cultivo, que contiene cantidades significativas de otras proteasas, por ejemplo la clostripaína. Por consiguiente se añade sulfato amónico al líquido filtrado, inicialmente en concentraciones comprendidas entre 100 y 400 g/l y después en concentraciones entre 400 y 520 g/l. Se ha constatado que la recuperación de la colagenasa por precipitación es significativa en 400 g/l y se encuentra que el culote generado empleando esta concentración es más fácil de suspender de nuevo. Además, las concentraciones superiores a 400 g/l dan lugar aparentemente a una recuperación muy similar con respecto a las proteínas de colagenasas.

Con el fin de producir colagenasas a mayor escala, en WO 2007/089851 se describe la combinación de (1) una cepa de *C. histolyticum* elegida especialmente, (2) un proceso de fermentación en condiciones que optimizan la producción de colagenasas al tiempo que intentan reducir la producción de clostripaína y (3) un esquema de purificación de las colagenasas I/II.

Ambos elementos, la elección de la cepa de *C. histolyticum* y la fermentación en medio líquido contribuyen a reducir la clostripaína en el material en bruto empleado para el proceso de purificación. Por consiguiente, hay que tener en cuenta que las condiciones descritas en WO 2007/089851 son las de un esquema de purificación basado en la preparación en bruto con una actividad específica de clostripaína comprendida entre 0,7 y 5,5 U por mg de colagenasa total. Según tal publicación, estos valores reflejan además la proporción entre la clostripaína y la colagenasa en el líquido sobrenadante del cultivo, ya que no se observa una separación apreciable de la clostripaína como consecuencia de la precipitación con sulfato amónico. La cantidad comparativamente baja de clostripaína (entre 0,7 y 5,5 U por mg de colagenasa total) parece ser el resultado de la elección de las peptonas del caldo de fermentación. Se emplea en particular una peptona de origen porcino para conseguir este efecto.

Se obtiene una preparación de colagenasa en bruto, que contiene el producto de fermentación, por precipitación del caldo de fermentación con sulfato amónico.

El esquema de purificación de WO 2007/089851 parte de la filtración de la mezcla líquida de fermentación. Una vez añadido el sulfato amónico al líquido filtrado y separado el material insoluble, se realiza una cromatografía de interacción hidrófoba en presencia de sulfato amónico en la fase líquida. La leupeptina, un inhibidor (reversible) bien conocido de la clostripaína y otras serina- y cisteína-proteasas, se añaden a las fracciones eluidas, que contienen las colagenasas, lo cual indica que no se ha conseguido la separación completa de la clostripaína y/u otras proteasas. La leupeptina se separa durante un paso posterior del proceso de purificación.

Hay que tener también en cuenta que las preparaciones finales purificadas de colagenasa I y colagenasa II contienen además productos de degradación con N en posición terminal y, en el caso de la colagenasa I, productos de degradación con C en posición terminal.

El uso generalizado de la leupeptina en el método de purificación del WO 2007/089851 indica que incluso después de la cromatografía de interacción hidrófoba sigue estando presente una cantidad residual significativa de actividad proteolítica no deseada en las fracciones eluidas que contienen las colagenasas. Estas proteasas residuales constituyen un inconveniente en especial porque degradan rápidamente a las colagenasas deseadas, siendo la colagenasa de tipo I una diana especialmente sensible.

A diferencia del estado de la técnica, la presente invención se basa en un líquido filtrado o en un líquido sobrenadante del cultivo, en el que el caldo de fermentación del cultivo del *C. histolyticum* está libre de componentes de origen

mamífero (por ejemplo peptonas) y en el que la actividad específica de la clostripaína en el líquido filtrado o líquido sobrenadante se sitúa entre aprox. 10 y 200 U por mg de colagenasa total, con preferencia entre aprox. 50 y 200 U por mg de colagenasa total, con mayor preferencia entre aprox. 75 y 200 U por mg de colagenasa total, con mayor preferencia todavía entre aprox. 100 y 200 U por mg de colagenasa total.

De modo sorprendente, los inventores han encontrado que un paso de la precipitación con sulfato amónico ((NH₄)₂SO₄) antes de la cromatografía de interacción hidrófoba permite obtener un producto intermedio, que contiene las colagenasas deseadas de tipo I y de tipo II. Después de recuperado el precipitado y disuelto de nuevo puede realizarse la cromatografía de interacción hidrófoba para reducir la actividad de la clostripaína en un factor aproximado de 100 a 150 y la actividad de la tripsina en un factor de 100-400 en los líquidos eluidos reunidos resultantes, que contienen las colagenasas, dichos líquidos eluidos reunidos contienen el 80-95% de las colagenasas I y II combinadas, porcentaje referido a las cantidades presentes en el precipitado disuelto de nuevo. De ello resulta que, después de la cromatografía de interacción hidrófoba, la mezcla de colagenasas I y II es sustancialmente estable en ausencia de inhibidores de proteasa (p.ej. la leupeptina). Esto equivale a decir que, en las condiciones de la invención, no se detecta degradación proteolítica alguna de las colagenasas I o II, o si se detecta es solo en cantidades mínimas. Lo que es más importante, la separación de las proteasas concomitantes que no son colagenasas de la preparación es tan eficaz, que la purificación posterior de las colagenasas I y II conduce a productos de pureza excepcional y carentes de degradación de extremos terminados en N.

Resumen de la invención

Un aspecto de la invención es un método de purificación parcial de las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del *Clostridium histolyticum* de una mezcla compleja, que consiste en los pasos de (a) preparar la mezcla compleja disuelta en una fase líquida acuosa; (b) formar un precipitado de proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II disolviendo el sulfato amónico en la fase líquida del paso (a); (c) separar el precipitado del paso (b) de la fase líquida; (d) disolver el precipitado del paso (c) en un tampón acuoso que contiene iones Ca²⁺ y tiene un pH entre 6,0 y 8,0, y ajustar la conductividad del tampón con el precipitado disuelto a un valor comprendido entre 50 y 300 mS/cm, formándose una solución compleja tamponada que contiene las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II; (e) extraer la solución compleja tamponada del paso (d) poniéndola en contacto con una fase estacionaria hidrófoba y adsorbiendo las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II sobre la fase estacionaria; (f) separar la fase estacionaria hidrófoba junto con las proteínas de colagenasas adsorbidas de tipo I y de tipo II del paso (e) de la solución extraída; (g) eluir las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II de la fase estacionaria del paso (f); purificar de este modo las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II. Se describe también una preparación que contiene proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II de *Clostridium histolyticum*, enzimáticamente activas, obtenibles por el método de la invención. Se describe también una preparación purificada de colagenasa de tipo I de *Clostridium histolyticum* enzimáticamente activa, obtenible por el método de la invención. Se describe también una preparación purificada de colagenasa de tipo II de *Clostridium histolyticum* enzimáticamente activa, obtenible por el método de la invención. Se describe también una mezcla que contiene la colagenasa de tipo I del *Clostridium histolyticum* y la colagenasa de tipo II del *Clostridium histolyticum*, caracterizada porque se mezcla una primera cantidad medida de una preparación purificada según la invención con una segunda cantidad medida de una preparación purificada según la invención. Se describe además el uso de una preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* según la invención, una preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* según la invención o una mezcla según la invención para procesar una muestra de tejido, con lo cual se digiere el colágeno presente en la muestra.

Descripción detallada de la invención

Ciertos términos se emplean con significados especiales, o se definen por primera vez en la descripción de la presente invención. Para los fines de la presente invención, los términos empleados se definen en sus acepciones aceptadas en la técnica, si existen, excepto cuando estas definiciones entran en conflicto total o parcial con las definiciones que se establecen a continuación. En el caso de que surja un conflicto en la definición, el significado de un término se define ante todo por cualquiera de las definiciones que se establecen a continuación.

La presente invención se refiere a las colagenasas (EC 3.4.24.3) de tipo I y tipo II del *C. histolyticum* descritas previamente en Bond, M.D., van Wart, H.E., *Biochemistry* 23, 3077-3085, 1984 y Bond, M.D., van Wart, H.E., *Biochemistry* 23, 3085-3091, 1984.

El término "comprender" se emplea en la descripción de la invención y en las reivindicaciones para indicar "incluir, pero sin limitarse necesariamente a ello".

Los artículos "un" y "el" se emplean aquí para indicar uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A título ilustrativo, "un compuesto" significa por lo menos un compuesto o bien más de un compuesto.

5 Cuando se define un intervalo de valores numéricos, por ejemplo un intervalo de concentraciones, el intervalo se indica con la palabra “entre” seguida por el primer valor n1 y un segundo valor n2. El límite inferior del intervalo en cuestión se entiende que es el valor igual o superior al primer valor. El límite superior del intervalo en cuestión se entiende que es el valor igual o inferior al segundo valor. Por consiguiente un valor x se define por un intervalo indicado mediante $n1 \leq x \leq n2$.

10 A menos que se define de otro modo, se da por supuesto que el término “aproximadamente” en combinación con un valor numérico n indica un valor x situado dentro del intervalo definido por el valor numérico $\pm 5\%$ de dicho valor, es decir, $n - 0,05 * n \leq x \leq n + 0,05 * n$. En el caso de que el término “aproximadamente” en combinación con un valor numérico n describa una forma de ejecución preferida de la invención, el valor de n es el más preferido, a menos que se indique otra cosa.

15 La identificación de los aminoácidos se realiza con abreviaturas de tres letras, también mediante el alfabeto de una sola letra de los aminoácidos, es decir, Asp D significa ácido aspártico, Ile I isoleucina, Thr T treonina, Leu L leucina, Ser S serina, Tyr Y tirosina, Glu E ácido glutámico, Phe F fenilalanina, Pro P prolina, His H histidina, Gly G glicina, Lys K lisina, Ala A alanina, Arg R arginina, Cys C cisteína, Trp W triptofano, Val V valina, Gln Q glutamina, Met M metionina, Asn N asparagina.

20 La “mezcla compleja” que se purifica para obtener las proteínas de colagenasas contiene las proteínas de interés y una o varias impurezas. La composición puede estar “parcialmente purificada” (es decir, puede haberse sometido a uno o más pasos de purificación o puede obtenerse directamente a partir de un cultivo de *C. histolyticum* que produce las proteínas (p.ej. la mezcla compleja puede contener el líquido de cultivo recolectado).

25 Una “impureza” es un material que es diferente de cualquiera de las proteínas deseadas. La impureza incluye, pero no se limita a: una proteína de *C. histolyticum*, un polipéptido diferente de cualquiera de las proteínas deseadas, un ácido nucleico, endotoxina, componente de fago, etc. Tal como se emplea aquí, “proteína” indica en general polipéptidos que tienen más de diez aminoácidos. Cada una de las proteínas de la colagenasa I (“colagenasa de tipo I”) y colagenasa II (“colagenasa de tipo II”), incluidas cada una de las isoformas correspondientes, con la condición de que la proteína se caracterice por una actividad enzimática de colagenasa, se denomina también “proteína deseada”, “proteína diana” o “proteína de interés”. Un ejemplo de ello es cualquiera de las proteínas de colagenasas descritas por Bond, M.D., van Wart, H.E., *Biochemistry* **23**, 3085-3091, 1984. La forma plural de cualquiera de los términos “proteína deseada”, “proteína diana”, “proteína de interés”, “enzima colagenasa” o “proteína colagenasa” indica no solo las proteínas de colagenasas de tipo I, sino también las de tipo II, a menos que se indique explícitamente otra cosa. Se entiende por “purificar” una proteína de una composición, formada por la proteína y una o más impurezas, el aumento del grado de pureza de la proteína dentro de la composición, logrado por separación (completa o parcial) de por lo menos una impureza de la composición. Según la presente invención, la purificación de las proteínas de colagenasas se realiza por un proceso que consiste en la precipitación con sulfato amónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio catiónico, dichos pasos de purificación se realizan en el orden indicado. Un “paso de purificación” forma parte del proceso global de purificación que permite obtener una composición “homogénea” de proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del *C. histolyticum*. Por lo tanto, cuando está presente en una composición homogénea, una proteína se ha “purificado hasta la homogeneidad”. Las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II se purifican hasta la homogeneidad mediante un paso adicional posterior de cromatografía de intercambio aniónico.

45 El término “cromatografía” indica el proceso que permite separar un soluto de interés de otros solutos contenidos en una mezcla como resultado de las diferencias en las velocidades en las que los solutos individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario por la acción de una fase móvil, o bien por procesos de fijación y elución. Una “sal” es un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base. Las sales útiles para la invención incluyen, pero no se limitan a: cloruro (p.ej. cloruro sódico, cloruro cálcico) y sulfato (p.ej. sulfato amónico). Tal como se emplea aquí, “disolvente” indica una sustancia líquida capaz de disolver o dispersar una o más sustancias, formando una solución.

55 El término “intercambio iónico” y “cromatografía de intercambio iónico” indica el proceso cromatográfico, en el que un soluto de interés (por ejemplo una proteína) existente en una mezcla interacciona con un compuesto cargado, fijado (por ejemplo mediante enlace covalente) sobre un material de intercambio iónico en fase sólida, de modo que el soluto de interés interaccione de modo no específico con el compuesto cargado en mayor o menor grado que las impurezas o contaminantes que se hallan disueltos en la mezcla. Uno o más solutos contaminantes de la mezcla (impurezas) se eluyen de la columna del material de intercambio iónico con mayor o menor velocidad que el soluto de interés o se fijan sobre o se excluyen de la resina con respecto al soluto de interés. La “cromatografía de intercambio iónico” incluye específicamente la cromatografía de intercambio catiónico, de intercambio aniónico y la cromatografía mixta. Un “material de intercambio iónico” indica una fase sólida que está cargada negativamente (es decir, una resina de intercambio catiónico) o cargada positivamente (es decir, una resina de intercambio aniónico). La carga puede aportarse fijando uno o varios ligandos cargados sobre una fase sólida, p.ej. mediante enlace cova-

lente. Como alternativa, o además, la carga puede ser una propiedad inherente a la fase sólida (p.ej. en el caso de la sílice, que tiene una carga global negativa).

Se entiende por “fase sólida” o “fase estacionaria” una matriz no acuosa, a la que pueden adherirse uno o más ligandos cargados. La fase sólida o estacionaria puede ser una columna de purificación, una fase discontinua de partículas discretas, una membrana, un filtro, etc. Los ejemplos de materiales que pueden formar la fase sólida incluyen los polisacáridos (por ejemplo la agarosa y celulosa); y otras estructuras (matrices) mecánicamente estables, por ejemplo la sílice (p.ej. vidrio de tamaño de poro controlado), poli(estireno-divinil)benceno, poli(acrilamida), partículas cerámicas y derivados de uno cualquiera de los anteriores.

Una resina de “intercambio catiónico” indica una fase sólida que está cargada negativamente y, por tanto, tiene cationes libres para intercambiar con cationes en solución acuosa que pasa sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede ser, p.ej., un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico que son productos comerciales incluyen a la carboximetil-celulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado sobre agarosa (p.ej. SP-SEPHAROSE™ FAST FLOW o SP-SEPHAROSE™ HIGH PERFORMANCE) y sulfonilo inmovilizado sobre agarosa (p.ej. S-SEPHAROSE™ FAST FLOW). Una “resina de intercambio iónico mixto” indica una fase sólida que está modificada con restos catiónicos, aniónicos e hidrófobos unidos mediante enlaces covalentes.

El término “resina de intercambio aniónico” se emplea aquí para indicar una fase sólida cargada positivamente, p.ej. que tiene unidos a ella uno o varios ligandos cargados positivamente, por ejemplo grupos amonio cuaternario. Las resinas de intercambio aniónico que son productos comerciales incluyen la DEAE-celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST FLOW Q SEPHAROSE™.

Un “tampón” es una solución que resiste cambios de pH gracias a sus componentes conjugados ácido-base. Los diferentes tampones que pueden emplearse en función, por ejemplo, del pH deseado del tampón se describen en la obra “Buffers: A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems” (tampones: guía de preparación y uso de tampones en sistemas biológicos), Gueffroy, D., coord., Calbiochem Corporation (1975). En una forma de ejecución, el tampón tiene un pH comprendido entre 2 y 9, como alternativa entre 3 y 8, como alternativa entre 4 y 7, como alternativa entre 5 y 7. Los ejemplos no limitantes de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen los tampones MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y amonio, así como las combinaciones de estos.

Un “tampón de carga” es el que se emplea para cargas la composición que contiene la molécula del polipéptido de interés y una o más impurezas en la resina de intercambio iónico. El tampón de carga tiene una conductividad y/o pH tal que la molécula de polipéptido de interés (y en general una o más impurezas) se fije(n) sobre la resina de intercambio iónico o tal que la proteína de interés fluya a través de la columna, mientras las impurezas quedan atrapadas (fijadas) en la resina. El término “tampón de lavado” se emplea aquí para indicar el tampón empleado para lavar o reequilibrar la resina de intercambio iónico, antes de eluir la molécula de polipéptido de interés. De modo conveniente, el tampón de lavado y el tampón de carga pueden ser el mismo, pero no necesariamente. Un “tampón de elución” se emplea para eluir el polipéptido de interés, sacándolo de la fase sólida. La conductividad y/o el pH del tampón de elución es/son tales que el polipéptido de interés se eluya de la resina de intercambio iónico. Puede utilizarse un “tampón de regeneración” para regenerar la resina de intercambio iónico con vistas a su reutilización. El tampón de regeneración tiene una conductividad y/o pH requeridos para separar sustancialmente todas las impurezas y el polipéptido de interés que pudieran haber quedado atrapados en la resina de intercambio iónico.

El término “conductividad” indica la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye por transporte iónico. Por lo tanto, cuando aumenta la cantidad de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad mayor. Las unidades para expresar la conductividad son miliSiemens (mS) por centímetro (mS/cm) y puede medirse empleando el correspondiente medidor de conductividad. La conductividad de una solución puede alterarse cambiando la concentración de iones que contiene. Por ejemplo, la concentración de un agente tampón y/o la concentración de una sal (p.ej. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl o CaCl_2) en la solución puede alterarse con el fin de lograr la conductividad deseada. La concentración de sal de varios tampones se modifica con preferencia para lograr la conductividad deseada, tal como se describe en la siguiente sección de los ejemplos.

Se entiende por “fijación” (unión) de una molécula sobre una fase estacionaria (por ejemplo un material de interacción hidrófoba o un material de intercambio iónico) la exposición de la molécula a la fase estacionaria en condiciones apropiadas (pH/conductividad), de modo que la molécula se “adsorba” o se inmovilice de modo reversible en o sobre la fase estacionaria. Esto puede lograrse en virtud de las interacciones hidrófobas o iónicas entre la molécula y uno o varios grupos funcionales de la fase estacionaria. Se entiende por “lavado” de la fase estacionaria la acción de pasarla con un tampón apropiado a través o por encima de la fase estacionaria. En una forma preferida de ejecución de la invención, las proteínas deseadas permanecen adsorbidas o fijadas sobre la fase estacionaria durante el proceso de lavado. Se entiende por “eluir” una molécula (p.ej. un polipéptido deseado o una impureza) de la fase

estacionaria la acción de sacar la molécula de dicha fase alterando un parámetro elegido entre el grupo formado por la composición, conductividad, fuerza iónica y pH del tampón que rodea la fase estacionaria, de modo que la molécula se suelte del o de los grupos funcionales de la fase estacionaria que la retienen.

5 La presente invención proporciona métodos de purificación de proteínas de colagenasas enzimáticamente activas del líquido sobrenadante del cultivo de *C. histolyticum*, del líquido filtrado o similares, es decir, una solución compleja que contiene proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II en estado disuelto. Con el fin de limitar la digestión proteolítica de las proteínas deseadas se enfría la solución compleja a una temperatura de 2°C a 10°C. Los siguientes pasos de purificación se realizan a una temperatura de este intervalo, si no se indica otra cosa.

10 Una vez se ha obtenido la solución que contiene las proteínas de interés, su separación de los componentes molestos de la solución se emprende normalmente empleando una combinación de diferentes técnicas cromatográficas. Los componentes molestos (no deseados) incluyen los componentes residuales del medio de cultivo (por ejemplo proteínas, peptonas, hidratos de carbono y otros compuestos) u otras proteínas producidas por la célula (es decir, proteínas de no colagenasas).

15 En una primera forma de ejecución de la invención, antes de la purificación cromatográfica se realiza un paso de precipitación con sulfato amónico. Gracias a la precipitación, una porción significativa de los componentes molestos se separa de las proteínas de colagenasas. En el líquido sobrenadante del cultivo, el líquido filtrado o similares (también denominados colectivamente "líquido sobrenadante segregado del cultivo") se forma un precipitado, que contiene las proteínas de colagenasas, en presencia de sulfato amónico de una concentración comprendida entre 2,6 M y 2,8 M (la concentración deseada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

20 La precipitación con sulfato amónico es un método de purificación de proteína que consiste en alterar la solubilidad de las proteínas. Es un caso específico de una técnica más general, ya conocida como salado excluyente (salting out). Se emplea habitualmente el sulfato amónico porque su solubilidad es tan elevada que permite obtener soluciones salinas de fuerza iónica elevada. La solubilidad de las proteínas varía en función de la fuerza (concentración) iónica de la solución y, por lo tanto, en función de la concentración de sales. Se observan dos efectos distintos: en concentraciones bajas de sal, la solubilidad de la proteína aumenta a medida que aumenta la concentración de la sal (es decir, a medida que aumenta la fuerza iónica), efecto denominado salado incluyente (salting in). Si la concentración (fuerza iónica) de las sales sigue aumentando, la solubilidad de la proteína empieza disminuir. Cuando la concentración iónica es suficientemente elevada, la proteína precipitará caso por completo de la solución (salado excluyente). Dado que las proteínas difieren marcadamente por su solubilidades cuando la concentración iónica es elevada, el salado excluyente es un procedimiento muy útil que facilita la purificación de una proteína determinada. La sal que se emplea habitualmente es el sulfato amónico, porque es muy soluble en agua y no tiene efectos adversos en la actividad de la enzima. El sulfato amónico puede añadirse en estado sólido con agitación continua de la fase líquida. Como alternativa, el sulfato amónico puede añadirse en forma de solución concentrada, p.ej. en forma de solución acuosa saturada. El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se añade con preferencia de forma continua durante un período de unos 30 min al líquido sobrenadante del cultivo, líquido filtrado o similares, y se disuelve en él con el fin de alcanzar la concentración deseada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

35 Después de ajustar la concentración del sulfato amónico entre 2,6 M y 2,8 M se deja formar el precipitado durante un período comprendido entre 10 min y 30 min. Se separa por centrifugación la proteína precipitada y después se eleva la concentración del sulfato amónico hasta un valor tal que precipite la mayor parte de la proteína de interés, pero dejando todavía en solución la cantidad máxima posible de los contaminantes de la proteína. Se recupera la proteína precipitada de interés por centrifugación y se disuelve en un tampón recién preparado para el siguiente paso de purificación.

45 Esta técnica es útil para separar rápidamente grandes cantidades de proteínas contaminantes como primer paso del esquema de purificación de la invención. Puede realizarse también durante los pasos posteriores de purificación para concentrar la proteína a partir de una solución diluida con arreglo a procedimientos tales como la filtración a través de gel y otras técnicas cromatográficas de separación.

50 Las técnicas cromatográficas permiten separar mezclas de proteínas en base a su carga, su grado de carácter hidrófobo o su tamaño. Para cada una de estas técnicas existen varias resinas cromatográficas distintas que son productos comerciales y permiten ajustar cuidadosamente y "a medida" el esquema de purificación a la proteína concreta de interés. Lo esencial de cada uno de estos métodos separativos consiste en que las proteínas pueden obligarse a moverse con diferentes velocidades hacia la parte inferior de la columna, realizando una separación física que aumenta a medida que van descendiendo a lo largo de la columna, o bien pueden obligarse a adherirse selectivamente al medio de separación, siendo eluidas después con velocidades diferentes por disolventes diferentes. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando las impurezas se unen específicamente a la columna, mientras que la proteína de interés no se adhiere, es decir, la proteína de interés está presente en el líquido que "fluye a través" de la columna.

La cromatografía de intercambio iónico, nombrada en función del contraión intercambiable, es un procedimiento aplicable a la purificación de moléculas ionizables. Las moléculas ionizadas se separan debido a la interacción electrostática no específica de sus grupos cargados con moléculas que llevan cargas opuestas, que se hallan fijadas sobre la estructura (matriz) de soporte de fase sólida, con lo cual retrasan aquellas moléculas ionizadas que interactúan con mayor intensidad con la fase sólida. La carga neta de cada tipo de moléculas ionizadas y su afinidad con la matriz varían en función del número de grupos cargados, de la carga de cada grupo y de la naturaleza de las moléculas que compiten por la interacción con la matriz de fase sólida cargada. Estas diferencias se traducen en la resolución de varios tipos de molécula por cromatografía de intercambio iónico. En una purificación típica de proteínas realizando una cromatografía de intercambio iónico, se introduce una mezcla de muchas proteínas derivadas de una célula hospedante, por ejemplo un cultivo de células de mamífero, en una columna de intercambio iónico. Después de eliminar por lavado las moléculas que no están fijadas, se ajustan las condiciones, por ejemplo cambiando el pH, la concentración de contraiones y otras similares en el paso o el modo de gradiente para sacar de la fase sólida la proteína de interés que no se haya retenido específicamente o se haya ionizado con retraso, separándola de este modo de las proteínas que tienen diferentes características de carga. La cromatografía de intercambio aniónico implica la competición de una molécula aniónica de interés con el contraión negativo por la interacción con una molécula cargada positivamente que está fijada sobre la matriz de fase sólida en el pH y en las condiciones de un proceso separativo concreto. En cambio, la cromatografía de intercambio catiónico implica la competición de una molécula catiónica de interés con el contraión positivo por una molécula cargada negativamente que se halla fijada sobre la matriz de fase sólida en el pH y en las condiciones de un proceso separativo concreto. La cromatografía de intercambio iónico en modo mixto implica el uso de una combinación de medios cromatográficos de intercambio catiónico y aniónico en el mismo paso. En particular, el "modo mixto" indica una matriz de soporte de fase sólida, a la que está unida con enlace covalente una mezcla de restos de intercambio catiónico, intercambio aniónico e interacción hidrófoba.

La cromatografía de interacción hidrófoba (también abreviada con "HIC") es una técnica separativa que se basa en las propiedades hidrófobas para separar las proteínas entre sí. En este tipo de cromatografía están unidos a la fase estacionaria los grupos hidrófobos, por ejemplo el fenilo, octilo o butilo. Las proteínas que pasan a través de la columna y que tienen cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos en sus superficies son capaces de interaccionar con y fijarse sobre los grupos hidrófobos de la columna. Normalmente, en una separación HIC se introduce inicialmente en la columna un tampón que tenga una fuerza iónica elevada, por lo general el sulfato amónico. La sal del tampón reduce la solvatación de los solutos de la muestra, de modo que disminuye la solvatación, las regiones hidrófobas que quedan expuestas son adsorbidas por el medio. Cuanto más hidrófoba se la molécula diana a adsorber, tanta menos cantidad de sal se necesitará para intensificar la unión. Para eluir las proteínas adsorbidas de la fase estacionaria, se reduce la concentración de sal con el fin de aumentar el carácter hidrófobo. La disminución gradual puede aplicarse en forma de gradiente. Además, la elución puede realizarse también con el uso de ciertos modificadores orgánicos o con el uso de un detergente.

Para la HIC, la fase estacionaria es capaz de generar interacciones hidrófobas con otras moléculas. Estas interacciones son demasiado débiles en el agua. Sin embargo, la adición de sales al tampón se traduce en interacciones hidrófobas. Las sales que aumentan las interacciones hidrófobas incluyen (en el orden de sus capacidades de intensificar las interacciones): Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr y NaSCN .

Aunque la cromatografía en fase inversa y la cromatografía de interacción hidrófoba son muy similares, los ligandos de la cromatografía en fase inversa suelen ser mucho más hidrófobos que los ligandos de la cromatografía de interacción hidrófoba. Esto permite que la cromatografía de interacción hidrófoba pueda recurrir a condiciones de elución más moderadas, que no disgregan la muestra más de lo necesario. Una fase estacionaria preferida para realizar la HIC incluye al TOYOPEARL™ Phenyl-650, Phenyl SEPHAROSE™ CL-4B, Phenyl SEPHAROSE™ 6 FAST FLOW (HIGH SUB) y Phenyl SEPHAROSE™ 6 FAST FLOW (LOW SUB).

Una ventaja importante proporcionada por la presente invención es la purificación parcial optimizada que separa en particular la actividad de la clostripaína actividad de las proteínas de las colagenasas. Por lo tanto, la degradación de las proteínas de colagenasas queda minimizada durante los pasos posteriores de purificación. Con mayor detalle se describen los siguientes aspectos y formas preferidas de ejecución.

1. Un método para purificar proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del *Clostridium histolyticum* a partir de una mezcla compleja, que consta de los pasos siguientes:

- (a) preparar la mezcla compleja disuelta en una fase líquida acuosa;
- (b) formar un precipitado de proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II disolviendo sulfato amónico en la fase líquida del paso (a);
- (c) separar el precipitado del paso (b) de la fase líquida;
- (d) disolver el precipitado del paso (c) en un tampón acuoso que contiene iones Ca^{2+} y un pH entre 6,0 y 8,0 y ajustar la conductividad del tampón con el precipitado disuelto a un valor comprendido entre 50 y 300 mS/cm,

- con lo cual se forma una solución compleja tamponada que contiene las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II;
- (e) extraer la solución compleja tamponada del paso (d) poniéndola en contacto con una fase estacionaria hidrófoba, y adsorber las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II sobre la fase estacionaria;
- 5 (f) separar la fase estacionaria hidrófoba que ha adsorbido las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del paso (e) de la solución extraída;
- (g) eluir las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II de la fase estacionaria del paso (f); purificando de este modo las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II.
- 10 2. El método del apartado 1, caracterizado porque el paso (b) se realiza disolviendo sulfato amónico en la fase líquida hasta una concentración comprendida entre 2,6 M y 3,2 M, con mayor preferencia entre 2,6 M y 2,8 M, formándose de este modo el precipitado que contiene las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II.
3. El método del apartado 2, caracterizado porque se disuelven entre 417 g y 458 g de sulfato amónico en 1 l de fase líquida.
- 15 4. El método de uno cualquiera de los apartados 2 y 3, caracterizado porque después del paso (c) en el material susceptible de disolución del precipitado la actividad proteolítica de la clostripaína se reduce en un factor de 90 a 150 y la actividad triptica se reduce en un factor de 100 a 400, referidos a las correspondientes actividades proteolíticas de la mezcla compleja disuelta del paso (a).
5. El método del apartado 4, caracterizado porque la actividad proteolítica de la clostripaína se reduce en un factor de 100 a 150 y la actividad triptica se reduce en un factor de 200 a 400.
- 20 6. El método del apartado 5, caracterizado porque la actividad proteolítica de la clostripaína se reduce en un factor de hasta 150 y la actividad triptica se reduce en un factor de hasta 400.
7. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 6, caracterizado porque después del paso (c) se realiza otro paso (c') que consiste en almacenar el precipitado a una temperatura de 10°C o inferior.
- 25 8. El método del apartado 7, caracterizado porque la temperatura de almacenaje se sitúa entre 10°C y -20°C.
9. El método del apartado 8, caracterizado porque la temperatura de almacenado es de -20°C.
10. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 9, caracterizado porque en el paso (d) el tampón acuoso contiene iones Ca^{2+} en una concentración de 5 mM.
- 30 11. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 10, caracterizado porque en el paso (d) el tampón acuoso está formado por un compuesto tampón capaz de tamponar el pH entre 6 y 8,5.
12. El método del apartado 11, caracterizado porque el compuesto tampón está presente en una concentración de 20 mM.
13. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 12, caracterizado porque en el paso (d) el tampón acuoso contiene un compuesto tampón elegido entre el grupo formado por el BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-amino-etanosulfónico), Tris (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), BisTris (bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)-metano), BisTris-propano (1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano), HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), MOPSO (ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico), PIPES (ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico)), TAPS (ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano-sulfónico), TEA (trietanolamina) y tricina (N-(2-hidroxietil)-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina).
- 40 14. El método del apartado 13, caracterizado porque en el paso (d) el tampón acuoso contiene TES o HEPES.
15. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 14, caracterizado porque en el paso (d) el pH del tampón acuoso es neutro.
16. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 15, caracterizado porque en el paso (d) el pH de la solución compleja tamponada es neutro.
- 45 17. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 16, caracterizado porque en el paso (d) la conductividad de la solución compleja tamponada se sitúa entre 50 mS/cm y 290 mS/cm.
18. El método del apartado 17, caracterizado porque en el paso (d) la conductividad de la solución compleja tamponada se sitúa entre 50 mS/cm y 200 mS/cm.
- 50 19. El método del apartado 18, caracterizado porque en el paso (d) la conductividad de la solución compleja tamponada se sitúa entre 50 mS/cm y 150 mS/cm.
20. El método del apartado 19, caracterizado porque en el paso (d) la conductividad de la solución compleja tamponada se sitúa entre 90 mS/cm y 100 mS/cm.
21. El método del apartado 20, caracterizado porque en el paso (d) la conductividad de la solución compleja tamponada se sitúa en torno a 95 mS/cm.
- 55 22. El método de uno cualquiera de los apartados de 17 a 21, caracterizado porque la concentración de sulfato amónico en la solución compleja tamponada se sitúa entre 0,3 M y 1 M.
23. El método del apartado 22, caracterizado porque la concentración de sulfato amónico en la solución compleja tamponada se sitúa en torno a 0,6 M y con mayor preferencia en 0,6 M.
- 60 24. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 23, caracterizado porque la fase estacionaria del paso (f) es una matriz de fase sólida derivatizada con restos orgánicos hidrófobos.
25. El método del apartado 24, caracterizado porque la fase estacionaria del paso (f) es una matriz de fase sólida derivatizada con un resto orgánico elegido entre el grupo formado por hexilo, butilo, octilo y fenilo.

26. El método de uno cualquiera de los apartados 24 y 25, caracterizado porque la matriz de fase sólida se elige entre el grupo formado por la agarosa, un derivado metacrilato, un polímero de acrilamida, un copolímero que contiene acrilamida, un polímero derivado de monómeros vinilo (polímero vinílico) y un copolímero que contiene estireno y divinilbenceno.
- 5 27. El método de uno cualquiera de los apartados de 24 a 26, caracterizado porque la fase estacionaria del paso (f) se elige entre el grupo formado por el TOYOPEARL™ Phenyl-650, Phenyl SEPHAROSE™ CL-4B, Phenyl SEPHAROSE™ 6 FAST FLOW (HIGH SUB) y Phenyl SEPHAROSE™ 6 FAST FLOW (LOW SUB).
28. El método del apartado 27, caracterizado porque la fase estacionaria del paso (f) es Phenyl SEPHAROSE™ 6 FAST FLOW (LOW SUB).
- 10 29. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 28, caracterizado porque después del paso (f) se realiza otro paso (f') que consiste en lavar la fase estacionaria del paso (f) con un tampón acuoso de lavado que contiene iones Ca^{2+} y tiene pH neutro y una conductividad de 50 mS/cm a 300 mS/cm, con lo cual las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II permanecen adsorbidas sobre la fase estacionaria.
- 15 30. El método del apartado 29, caracterizado porque la conductividad del tampón de lavado es la misma que la conductividad de la solución compleja tamponada del paso (d).
31. El método de uno cualquiera de los apartados 29 y 30, caracterizado porque la concentración de iones Ca^{2+} y/o la concentración de sulfato amónico y/o el pH del tampón de lavado son los mismos que los de la solución compleja tamponada del paso (d).
- 20 32. El método de uno cualquiera de los apartados de 29 a 31, caracterizado porque el paso (g) se realiza eluyendo las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II de la fase estacionaria del paso (f').
33. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 32, caracterizado porque el paso (g) se realiza con un tampón de elución, dicho tampón de elución contiene sal en una concentración menor y una conductividad menor que las que tiene la solución compleja tamponada.
34. El método del apartado 33, caracterizado porque el paso (g) se realiza con un gradiente de concentraciones de sal con respecto a la fase estacionaria.
- 25 35. El método del apartado 33, caracterizado porque el paso (g) se realiza aplicando uno o más tampones de elución y efectuando una elución isocrática.
36. El método del apartado 33, caracterizado porque en el paso (g) se eluyen las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II aplicando un tampón de elución a la fase estacionaria, con lo cual la conductividad del tampón de elución se sitúa en un 20% por debajo de la conductividad de la solución compleja tamponada.
- 30 37. El método del apartado 36, caracterizado porque la conductividad del tampón de elución se sitúa en torno a 76 mS/cm.
38. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 37, caracterizado porque la mezcla compleja contiene otras enzimas con actividad proteolítica.
- 35 39. El método del apartado 38, caracterizado porque la mezcla compleja contiene una enzima con actividad proteolítica elegida entre el grupo formado por la clostripaina (endoproteinasa Arg-C, EC 3.4.22.8), una proteasa neutra y una enzima con actividad trípica.
40. El método de uno cualquiera de los apartados 38 y 39, caracterizado porque la mezcla compleja es el líquido sobrenadante o el líquido filtrado de un cultivo líquido de *Clostridium histolyticum*.
- 40 41. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 40, caracterizado porque las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II obtenibles en el paso (g) y opcionalmente en un paso posterior de separación del sulfato amónico son enzimáticamente activas.
42. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 41, caracterizado porque después del paso (g) se realiza un paso posterior, en dicho paso posterior se separa el sulfato amónico de las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II.
- 45 43. El método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 42, caracterizado porque las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del paso (g) se siguen purificando por cromatografía de intercambio catiónico, en el cual la actividad proteolítica residual se sigue separando de las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II.
44. El método del apartado 43, caracterizado porque la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en presencia de iones Ca^{2+} en una concentración en torno a 5 mM, un compuesto tampón y a pH neutro.
- 50 45. El método de uno cualquiera de los apartados 43 y 44, caracterizado porque la concentración del compuesto tampón es de 20 mM.
46. El método del apartado 45, caracterizado porque el compuesto tampón se elige entre el grupo formado por el BES, Tris, BisTris, BisTris-propano, HEPES, MES, MOPS, MOPSO, PIPES, TAPS, TES, TEA, y tricina.
- 55 47. El método del apartado 46, caracterizado porque el compuesto tampón es el TES o HEPES.
48. El método del apartado 44, caracterizado porque la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en presencia de CaCl_2 en una concentración en torno a 5 mM.
49. El método de uno cualquiera de los apartados de 43 a 48, caracterizado porque la fase estacionaria de intercambio catiónico es la SP SEPHAROSE™.
- 60 50. El método de uno cualquiera de los apartados de 43 a 49, caracterizado porque se separan las proteínas de tipo I y tipo II realizando los pasos siguientes:
- (A) poner en contacto las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II purificadas adicionalmente con una fase estacionaria de intercambio aniónico, y adsorber las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II sobre la fase estacionaria;

(B) eluir, en fracciones separadas, las proteínas de la colagenasa de tipo I y la colagenasa de tipo II a partir de la fase estacionaria del paso (A);

con lo cual se purifican por separado las proteínas de la colagenasa de tipo I y la colagenasa de tipo II.

51. El método del apartado 50, caracterizado porque el paso (A) se lleva a cabo en presencia de iones Ca^{2+} en una concentración en torno a 5 mM, un compuesto tampón y un pH neutro o ligeramente alcalino.
52. El método de uno cualquiera de los apartados 50 y 51, caracterizado porque el paso (B) se realiza efectuando una elución de gradiente que consiste en aplicar un gradiente de concentraciones 1x-25x de un tampón de elución que, en la concentración 1x, contiene iones Ca^{2+} en una concentración en torno a 35 mM, un compuesto tampón y un pH entre neutro y ligeramente alcalino, dicha 1x es la concentración inicial y 25x es la concentración final del gradiente.
53. El método de uno cualquiera de los apartados 51 y 52, caracterizado porque el pH ligeramente alcalino es 7,5.
54. El método de uno cualquiera de los apartados 51 y 52, caracterizado porque la concentración de compuesto tampón es 5mM.
55. El método del apartado 54, caracterizado porque el compuesto tampón se elige entre el grupo formado por el BES, Tris, BisTris, BisTris-propano, HEPES, MES, MOPS, MOPSO, PIPES, TAPS, TES, TEA, y tricina.
56. El método del apartado 55, caracterizado porque el compuesto tampón es el TES o el HEPES.
57. El método del apartado 51, caracterizado porque el paso (A) se realiza en presencia de CaCl_2 en una concentración en torno a 5 mM.
58. El método del apartado 52, caracterizado porque en el paso (B) el tampón de elución, de la concentración 1x, contiene el CaCl_2 en una concentración en torno a 35 mM.
59. El método de uno cualquiera de los apartados de 50 a 58, caracterizado porque la fase estacionaria de intercambio aniónico es Q-SEPHAROSE™.
60. El método de uno cualquiera de los apartados de 43 a 59, caracterizado porque las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II obtenibles en el paso (B) son enzimáticamente activas.
61. El método de uno cualquiera de los apartados de 50 a 60, caracterizado porque las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II se obtienen en fracciones separadas.
62. Preparación que contiene las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II enzimáticamente activas del *Clostridium histolyticum*, obtenibles por el método de uno cualquiera de los apartados de 1 a 42.
63. La preparación del apartado 62, caracterizada porque en dicha preparación se reduce la actividad proteolítica triptica en un factor de 100 a 400, si se compara con la mezcla compleja del líquido sobrenadante o líquido filtrado del cultivo líquido de *Clostridium histolyticum*.
64. Preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum*, obtenible por el método del apartado 61.
65. Preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* del apartado 64, caracterizada porque el 82% de la proteína colagenasa de tipo I de la preparación tiene un peso molecular de 113.920 Da, determinado por CL-EM (ESI).
66. Preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* del apartado 65, caracterizada porque el 82% de la proteína colagenasa de tipo I está intacto en el extremo N.
67. Preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* del apartado 66, caracterizada porque el extremo N de la proteína colagenasa de tipo I tiene la secuencia de aminoácidos IANTNS.
68. Preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum*, obtenible por el método del apartado 61.
69. Preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* del apartado 68, caracterizada porque el 93% de la proteína colagenasa de tipo II de la preparación tiene un peso molecular de 112.000 Da, determinado por CL-EM (ESI).
70. Preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* del apartado 69, caracterizada porque un 93% de la proteína colagenasa de tipo II está intacto en el extremo N.
71. Preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* del apartado 70, caracterizada porque el extremo N de la proteína colagenasa de tipo II tiene la secuencia de aminoácidos VQNESK.
72. Preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* de uno cualquiera de los apartados de 64 a 67, caracterizada porque la actividad de la clostripaína en la preparación es inferior a 0,04 U/mg de proteína y se sitúa con mayor preferencia entre 0,01 U/mg de proteína y 0,03 U/mg de proteína.
73. Preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* de uno cualquiera de los apartados de 68 a 71, caracterizada porque la actividad de clostripaína de la preparación es inferior a 0,07 U/mg de proteína y se sitúa con mayor preferencia entre 0,04 U/mg de proteína y 0,06 U/mg de proteína.
74. Preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* de uno cualquiera de los apartados de 64 a 67, caracterizada porque la actividad de tripsina de la preparación es inferior a 0,0003 U/mg de proteína y se sitúa con mayor preferencia entre 0,0001 U/mg de proteína y 0,0003 U/mg de proteína.
75. Preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* de uno cualquiera de los apartados de 68 a 71, caracterizada porque la actividad de tripsina de la preparación es inferior a 0,001 U/mg de proteína y se sitúa con mayor preferencia entre 0,0003 U/mg de proteína y 0,001 U/mg de proteína.

76. Mezcla que contiene la colagenasa de tipo I del *Clostridium histolyticum* y la colagenasa de tipo II del *Clostridium histolyticum* caracterizada porque se mezcla una cantidad medida en primer lugar de una preparación purificada de uno cualquiera de los apartados de 64 a 67 con una cantidad medida en segundo lugar de una preparación purificada de uno cualquiera de los apartados de 68 a 71.

5 77. La mezcla del apartado 76, caracterizada porque contiene además una cantidad medida en tercer lugar de una preparación de otra enzima proteolítica.

78. Uso de una preparación purificada de colagenasa de tipo I enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* de uno cualquiera de los apartados de 64 a 67 y de uno cualquiera de los apartados 72 y 74 para procesar una muestra de tejido, en dicho proceso se digiere el colágeno presente en la muestra.

10 79. Uso de una preparación purificada de colagenasa de tipo II enzimáticamente activa del *Clostridium histolyticum* de uno cualquiera de los apartados de 68 a 71 y de uno cualquiera de los apartados 73 y 75 para procesar una muestra de tejido, en dicho proceso se digiere el colágeno presente en la muestra.

80. Use de una mezcla de uno cualquiera de los apartados 76 y 77 para procesar una muestra de tejido, en dicho proceso se digiere el colágeno presente en la muestra.

15 Los siguientes ejemplos y figuras se facilitan para una mejor comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se define en las reivindicaciones anexas. Se da por supuesto que se pueden introducir modificaciones en los procedimientos descritos sin apartarse del espíritu de la invención.

20 Descripción de las figuras

Figura 1: Estabilidad de las proteínas de colagenasa de tipo II y tipo I después de la cromatografía de interacción hidrófoba. Los análisis MONO-Q™ se realizan con arreglo al ejemplo 5. Se representa la superposición de cuatro cromatogramas. Los picos marcados con "II" y "I" indican las proteínas de colagenasa de tipo II y tipo I, respectivamente. Las flechas marcadas con "a", "b", "c", y "d" indican la altura del pico principal correspondiente a las proteínas de la colagenasa de tipo I después de la incubación de la mezcla purificada a 4°C durante 0 días ("a"), 2 días ("b"), 3 días ("c") y 6 días ("d").

30 Figura 2: Cromatograma MONO-Q™ (método: ver ejemplo 5) de proteínas de colagenasas de tipo II y tipo I después de la cromatografía de interacción hidrófoba. Los picos se marcan del mismo modo que en la figura 1.

Figura 3: Cromatograma MONO-Q™ (método: ver ejemplo 5) de proteínas de colagenasas de tipo II y tipo I después de la cromatografía Red SEPHAROSE™ FAST FLOW. Los picos se marcan del mismo modo que en la figura 1.

35 Figura 4: Resultados ilustrativos de la HPLC/EM-ESI de la colagenasa purificada de tipo I. Ordenadas: mAU, abscisas: tiempo. Las alturas de los picos del grupo I (marcadas con "I") se sitúan entre 1180 unidades y 4720 unidades. Como comparación, la altura del pico principal del grupo II (marcado con "II") es de 207527 unidades.

40 Figura 5: Resultados ilustrativos de la HPLC/EM-ESI de la colagenasa purificada de tipo I. Ordenadas: mAU, abscisas: tiempo. Las alturas de los picos del grupo I (marcadas con "I") se sitúan entre 840 unidades y 3840 unidades. Como comparación, la altura del pico principal del grupo II (marcado con "II") es de 226388 unidades.

Ejemplo 1

45 Materiales en bruto que contienen proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del *C. histolyticum*

El material en bruto preferido es un líquido sobrenadante segregado de un cultivo líquido de *C. histolyticum*. En la técnica ya se conocen los medios líquidos que promueven el crecimiento del *C. histolyticum* en cultivo. La bibliografía técnica reciente relativa a dichos medios incluye el WO 2007/089851. En lo que respecta a la separación de actividades proteolíticas no deseadas y a la pureza de las preparaciones finales de las proteínas de colagenasas, no se observan diferencias significativas entre diferentes medios de cultivo cuando se aplica el esquema de purificación de la invención que se describe seguidamente.

55 En un proceso de extrapolación gradual se cultiva el *C. histolyticum* en un cultivo líquido anaeróbico en atmósfera de nitrógeno. Un primer cultivo de siembra se inicia normalmente con un volumen aprox. de 100 ml. Los precultivos sucesivos se preparan gradualmente con volúmenes crecientes, p.ej. 1 l, 10 l, 50 l. Se lleva a cabo la fermentación a gran escala con volúmenes de cultivo comprendidos entre 100 l y 2.500 l. La temperatura de cultivo es de 30°C y el pH del medio de fermentación se mantiene en un valor aprox. de 7,3. A intervalos regulares se extraen muestras del cultivo y se ensaya la actividad proteolítica de la colagenasa del líquido sobrenadante del modo descrito en el ejemplo 2. Normalmente se recolecta un fermentador de gran capacidad después de pasadas de 15 h a 18 h después de la adición del precultivo.

Una vez terminada la fermentación se enfría el cultivo a una temperatura entre 2°C y 8°C. El material celular, las partículas de escombros y otros materiales divididos en partículas se separan del medio líquido por centrifugación o

por filtración, en ambos casos se obtiene el líquido sobrenadante segregado del cultivo. En caso de filtración se pasa el líquido filtrado por un material filtrante con un tamaño de poro comprendido entre 0,3 µm y 1 µm. Se obtienen buenos resultados con un material ACROPAK™ 500 (tamaño de poros: 0,45-0,8 µm).

5 Antes de efectuar los pasos posteriores de purificación se ensayan diversas actividades proteolíticas del líquido sobrenadante segregado del cultivo. Se incluyen entre ellas las actividades proteolíticas de las colagenasas (ver ejemplo 2), clostripaina (ver ejemplo 3) y tripsina (ver ejemplo 4). Se determina el contenido de proteínas por métodos convencionales, normalmente por espectroscopía UV, los ensayos de proteínas de Bradford-Lowry o de biuret o el ensayo del ácido bicinónico. Un líquido sobrenadante segregado del cultivo típico tiene un contenido de proteínas aprox. de 1,5 g/l y una actividad de colagenasa aprox. de 4 kU/l.

10 Como alternativa se pueden utilizar como materiales de partida las preparaciones en bruto, por ejemplo los liofilizados de líquido sobrenadante del cultivo (Bond, M.D., van Ward, H.E., Biochemistry 23, 3077-3085, 1984). En este caso se procesa una solución acuosa de liofilizado según la invención del modo descrito posteriormente.

15 Ejemplo 2

Ensayo para determinar la actividad proteolítica de las colagenasa I y II

20 Se determina la actividad proteolítica de la colagenasa por un método estándar en unidades Wünsch (Wuensch, E., Heidrich, H.Z., Physiol. Chem. 333, 149-159, 1963) empleando un sustrato de péptido sintético. La actividad proteolítica de la colagenasa cataliza la hidrólisis del péptido de sustrato modificado ("Wuensch"), el 4-fenilazobenciloxycarbonil-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg (Bachem M1715) entre los restos Leu y Gly. Se define como una unidad (U) de actividad como la hidrólisis de 1 µM de péptido por minuto a 25°C, pH 7,1.

25 El péptido sustrato (también llamado "sustrato") se aporta en solución y en una concentración de 1 mg/ml. En primer lugar se disuelven 10 mg de péptido sustrato en 0,2 ml de metanol. Se aumenta el volumen de la solución hasta 10 ml por adición de TrisHCl 0,1 M, pH 7,1. Otros reactivos son una solución 0,1 M de CaCl₂ en agua y una mezcla de extracción formada por 5 partes en volumen de acetato de etilo y 1 parte en volumen de ácido cítrico 0,025 M en agua. Los tubos desecantes se utilizan en forma de tubos de ensayo que contienen 0,35-0,4 g de Na₂SO₄. Antes de su utilización, cada tubo desecante se sella con una lámina de tipo Parafilm.

30 Las reacciones con el control y con la muestra se realizan en tubos de ensayo con arreglo al siguiente esquema de pipeteo y de trabajo:

paso	solución	tubo ensayo control	tubo ensayo muestra
1	péptido sustrato CaCl ₂ se mezcla, se calienta a 25°C	1 ml 0,2 ml	1 ml 0,2 ml
2	material de muestra TrisHCl 0,1 M, pH 7,1 se mezcla, se incuba a 25°C durante 15 min; después de la incubación se transfiere una parte alícuota de la solución incubada a un volumen de la mezcla de extracción	-- 0,05 ml	0,05 ml --
3	solución incubada del paso 2 mezcla de extracción se mezclan inmediatamente en el vórtice durante 20 s, se transfieren unos 3 ml de la fase de acetato de etilo al tubo de secado, se mezcla en el vórtice y se transfiere el líquido sobrenadante a una cubeta; se mide la extinción (A) a 320 nm, recorrido de la luz en la cubeta: 1 cm	0,5 ml 6 ml	0,5 ml 6 ml
4	se calcula la actividad volumétrica [U/ml] = ΔA * d * 0,794		

A = valor de extinción medido
d: factor de dilución
ΔA = A_{muestra} - A_{control}
§ una solución que contiene las enzimas colagenasa de tipo I y tipo II juntas o una solución que contiene cada una de las enzimas por separado. El material de muestra utilizado en el ensayo se prepara normalmente diluyendo una solución que contiene la colagenasa de tipo I y/o tipo II. Las diluciones se realizan con TrisHCl 0,1 M, de pH 7,1; para cada medición se ajusta el correspondiente factor de dilución (d) y se elige con el fin de obtener un valor final de extinción comprendido entre 0,3 y 1,0. Las soluciones con la colagenasa de tipo I, pero sin la del tipo II, se diluyen 1:100; las soluciones que contienen la colagenasa de tipo II se diluyen 1:1.000. Se ensayan también como referencias los patrones que tienen cantidades conocidas de la colagenasa de tipo I y/o tipo II.

En las mezclas que contienen no solo las enzimas colagenasa de tipo I y sino también las de tipo II, la actividad de colagenasa II medida siempre es mayor que la actividad de la colagenasa I, cuando se realizan los ensayos de actividad empleando como sustrato el péptido de Wuensch. La colagenasa de tipo II purificada con arreglo al esquema completo de purificación según la invención y obtenida como producto final del modo descrito en el ejemplo 14 tiene una actividad específica comprendida entre 10 y 14 U por mg de proteína; la actividad específica de la colagenasa de tipo I purificada de igual manera se sitúa entre 0,1 y 0,3 U por mg de proteína.

Ejemplo 3

Ensayo para determinar la actividad proteolítica de la clostripaína

La actividad proteolítica de la clostripaína se determina por un método en el que se emplea un sustrato sintético. La actividad proteolítica de la clostripaína cataliza la hidrólisis del éster de etilo de la benzoil-L-arginina (también llamado "BAEE"), generando la benzoil-L-arginina y etanol. Esta reacción es específica de la clostripaína y el sustrato se convierte en un grado muy limitado por la actividad proteolítica de la colagenasa.

El sustrato sintético (también llamado "sustrato") se aporta en solución y con una concentración de 38 mM disuelto en tampón fosfato potásico 0,1 M de pH 7,6 ("PPB"). Otros reactivos son el PPB, ditioneitol 194 mM ("DTT") disuelto en PPB y una solución 0,01 M de CaCl₂.

Las reacciones con el control y con la muestra se realizan en tubos de ensayo con arreglo al siguiente esquema de pipeteo y de trabajo:

paso			
1	solución de tampón/sustrato: BAEE 0,73 mM, DTT 7,8 mM, CaCl ₂ 0,4 mM, 0,5 ml de solución de BAEE, 1 ml de solución de DTT, 1 ml de solución de CaCl ₂ se pipetea a un matraz de 25 ml; se añade el PPB hasta la marca de 25 ml; se mezcla la solución		
2	se aportan el material de muestra y los patrones en forma de materia seca sólida liofilizada ("muestra"). Inmediatamente antes de la medición se disuelve 1 ml de cada muestra en 1 ml de agua purificada (calidad HPLC) y se diluye añadiendo 49 partes en volumen de PPB a 1 parte en volumen de la muestra disuelta		
3	solución PPB solución de tampón/sustrato se mezcla, se incuba y se calienta a 25°C	tubo de ensayo de control 0,05 ml 3 ml	tubo de ensayo de muestra -- 3 ml
4	se inicia la reacción enzimática añadiendo la muestra se mezcla, se determina la extinción (A) a 255 nm, recorrido de la luz en la cubeta: 1 cm; se hace el seguimiento del cambio de extinción y se determina la ΔA/min en base al intervalo lineal de la curva	--	0,05 ml
5	se calcula la actividad volumétrica [U/ml] = 3,05/(ε ₂₅₅ * 0,05 * 1) * ΔA/min actividad volumétrica de la solución de muestra se deberán tomar en consideración todos los factores de dilución en el momento de calcular la actividad volumétrica		
A: valor de extinción medido ΔA = A _{muestra} - A _{control} ε ₂₅₅ = 0,81 [l * mM ⁻¹ * cm ⁻¹]			

La velocidad de reacción se mide como incremento de la absorbancia a 255 nm que resulta de la hidrólisis del sustrato BAEE. 1 U de actividad proteolítica de la clostripaína hidroliza 1 μm de BAEE por minuto a 25°C y pH 7,6 en las condiciones descritas previamente.

Ejemplo 4

Ensayo para determinar la actividad proteolítica triptica

La tripsina hidroliza con preferencia enlaces, cuyos grupos carboxilo son aportados por la Lys o Arg. La actividad proteolítica de la tripsina se mide por un método, en el que se emplea un sustrato sintético. La actividad proteolítica de la tripsina cataliza la hidrólisis de la CROMOZYM™ TRY, también llamada Z-Val-Gly-Arg-4-nitroanilina, formando la Z-Val-Gly-Arg y la 4-nitroanilina ("4NA").

ES 2 388 219 T3

El sustrato sintético (también llamado "sustrato") se aporta en solución y en una concentración de 10 mM disuelto en agua ultrapura. Otro reactivo es el CaCl₂ 0,02 M, TrisHCl 0,1 M de pH 8.

5 Las reacciones con el control y con la muestra se realizan en tubos de ensayo con arreglo al siguiente esquema de pipeteo y de trabajo:

paso			
1	solución de trabajo: se mezclan 12,88 partes en volumen de CaCl ₂ 0,02 mM, TrisHCl 0,1 M de pH 8 y 1,4 partes en volumen de solución 10 mM de sustrato; se dispensan partes alícuotas de 1,02 ml a las cubetas; se calientan a 25°C.		
2	se inicia la reacción enzimática añadiendo:		
	solución muestra [§] o control	tubo de ensayo de control 0,1 ml (solución de trabajo)	tubo de ensayo de muestra 0,1 ml (líquido de muestra)
3	se mezcla, se determina la extinción (A) a 405 nm, recorrido de la luz en la cubeta: 1 cm; se hace el seguimiento del cambio de extinción por lo menos durante 5 min y se determina ΔA/min en base al intervalo lineal de la curva		
4	se calcula la actividad volumétrica [U/ml] = 1,12/(ε ₄₀₅ * 0,1 * 1) * ΔA/min ΔA = A _{muestra} - A _{control} actividad enzimática total de la solución de muestra: se multiplica ΔA/min por el factor de dilución ε ₄₀₅ = 10,4 [1 * mM ⁻¹ * cm ⁻¹]		
[§] la muestra está formada normalmente por un líquido de muestra sin diluir, por ejemplo el líquido sobrenadante del cultivo y una parte alícuota de una fracción de un líquido eluido de la columna cromatográfica			

10 La velocidad de reacción se mide en forma de incremento de la absorbancia a 405 nm que resulta de la hidrólisis del sustrato. 1 U de actividad proteolítica de tripsina hidroliza 1 μM de CROMOZYM™ TRY por minuto a 25°C y pH 8 en las condiciones descritas previamente.

Ejemplo 5

15 Ensayo analítico HPLC con MONO-Q™

Se analizan por HPLC empleando una columna MONO-Q™ las partes de muestra de las fracciones cromatográficas. En cada caso están presentes no solo las proteínas de colagenasas de tipo I, sino también las de tipo II, la cromatografía con MONO-Q™ permite separar las proteínas. Las cantidades y la integridad de las proteínas puede evaluarse en base a los cromatogramas MONO-Q™ que se han registrado, p.ej. en un espectrómetro UV.

20 El análisis por HPLC se realiza empleando una columna MONO-Q™ 5/50 (GE, nº de artículo: 17-5166-01). Antes de introducir la muestra en la columna, esta se equilibra con CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 20 mM de pH 7,5 ("tampón A", 10 volúmenes de columna). Se introduce una muestra que normalmente incluye proteínas de las colagenasas de tipo I y II y se fija sobre el material de intercambio iónico, después de lava con 3 volúmenes de columna; la elución se realiza empleando 30 volúmenes de columna de tampón de elución que forman un gradiente lineal de concentraciones, que empieza con el tampón A y termina con NaCl 1 M, CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 20 mM de pH 7,5 ("tampón B") en una concentración del 15%. Otras proteínas no deseadas (ajenas) se eluyen en el intervalo de concentraciones superior al 15 % e inferior al 100 % de tampón B. A continuación se reacondiciona la columna pasando por ella 8 volúmenes de columna de tampón A.

30 Para la detección se emplea un espectrómetro UV. Se hace el seguimiento de la absorción en una longitud de onda de 280 nm.

Ejemplo 6

35 Análisis por espectrometría de masas de las proteínas de colagenasas

Se realiza el análisis de las proteínas purificadas por HPLC/EM-ESI: se separan las proteínas por HPLC en fase inversa empleando un instrumento Alliance HT (Waters) u otro equivalente. La columna preferida es la Vydac C18, Protein & Peptide, 250*2,1 mm, 218 TP 52 (Macherey & Nagel, Alemania). Se detectan las proteínas en línea con un detector UV a 226 nm. En modo de escaneo se detectan las proteínas por espectrometría de masas con detector de electropulverización (electrospray, EM-ESI), empleando un instrumento QTOF II (Waters).

45 Se ajustan las muestras a una concentración de proteína de 1 mg/ml en agua. Para cada análisis se inyectan 10 μl de solución de proteína y se analizan. Después de cada análisis se inyecta una muestra falsa (10 μl), formada solamente por agua, con el fin de evitar la contaminación cruzada (de la muestra posterior con restos de la anterior).

En la figura 4 se representan los resultados de una preparación de colagenasa de tipo I. Se obtienen dos grupos de picos, tal como se observa en la figura 4. El grupo II constituye aprox. el 90 % de la superficie total del pico. El pico principal dentro del grupo II tiene un peso molecular de 113.930 Da, que constituye el 82 % de la superficie total del pico. Un pico menor dentro del grupo II corresponde a un peso molecular de 113,410 Da, que supone el 8 % de la superficie total del pico.

En la figura 5 se representan los resultados de una preparación de colagenasa de tipo II. Se obtienen dos grupos de picos, tal como se desprende de la figura 5. El grupo II constituye el 93 % de la superficie total del pico, formado por un único pico principal. El pico corresponde a un peso molecular de 112.000 Da.

Ejemplo 7

Preparación de proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del *C. histolyticum* realizando una cromatografía Red SEPHAROSE™, SP SEPHAROSE™ y Q SEPHAROSE™

Todos los pasos descritos a continuación se realizan a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C, si no se indica otra cosa. Se obtiene un líquido sobrenadante segregado del cultivo del modo descrito en el ejemplo 1. En un primer paso se disuelve el sulfato amónico en el líquido sobrenadante a una concentración aprox. de 1,65 M. En un caso ilustrativo se disuelven 245,65 g de sulfato amónico en 1 l de líquido sobrenadante y se incuban durante un período de 8 h a 24 h. Se separa el precipitado de la fase líquida por centrifugación o por filtración. La fase líquida segregada se somete seguidamente a diafiltración con un tampón HEPES 0,01 M, CaCl₂ 1 mM de pH 7 (a continuación se llamará "tampón R1"); después de la diafiltración se ajusta la conductividad de la fase líquida a un valor inferior a 2 mS/cm, para ello se diluye la fase líquida con una cantidad adicional de tampón R1, si fuera necesario. Se ajusta el pH de la fase líquida con tampón Tris/HEPES a un valor comprendido entre 6,8 y 7,0.

Se determina el contenido de proteína midiendo la extinción de una dilución 1:20 de la fase líquida a 280 nm. La fase líquida se analiza además por HPLC con columna MONO-Q™ del modo descrito en el ejemplo 5.

Durante los siguientes pasos de cromatografía se mantiene el pH de toda la fase móvil en pH 7 ± 0,2, si no se indica otra cosa. Se equilibra una columna preparativa Red SEPHAROSE™ FAST FLOW con el tampón R1, después se introduce en ella la fase líquida y seguidamente se lava con 2 ó más volúmenes de columna de tampón R1, hasta que la densidad óptica a 280 nm del líquido que sale de la columna alcance la línea base, valor que ya no cambiará de modo significativo. Por consiguiente, la línea base solamente reflejará al final pequeñas cantidades de proteína en el tampón de lavado. A continuación se eluye la columna con un tampón de elución que contiene Tris-HCl 0,02 M, CaCl₂ 1 mM, NaCl 1 M, de pH 9 (que a continuación se llamará "tampón R2"). Se recoge el líquido eluido y se somete a diafiltración con HEPES 20 mM, CaCl₂ 5 mM de pH 7 (que a continuación se llamará "tampón S1"); se ajusta el contenido de proteína de la fase líquida a 5 mg/ml y se ajusta la conductividad a un valor inferior a 2 mS/cm, para ello se diluye la fase líquida con una cantidad adicional del tampón S1, si fuera necesario.

En el paso siguiente se realiza la cromatografía preparativa con SP SEPHAROSE™. Con el fin de acondicionar el material de la columna se lava en primer lugar la columna de SP SEPHAROSE™ con agua; seguidamente se pasa por la columna medio volumen de columna de CaCl₂ 0,5 M y 2,5 volúmenes de columna de HEPES 100 mM, CaCl₂ 5 mM de pH 7. Después se lava la columna con tampón S1; se equilibra la columna con tampón S1 hasta que el líquido eluido presente el pH (± 0.2) del líquido sometido a diafiltración y de la fase líquida ajustada obtenida después de la cromatografía en columna Red SEPHAROSE™. A continuación se introduce en la columna SP SEPHAROSE™ dicha fase líquida que contiene las proteínas de colagenasas y otras impurezas. Después del paso de la carga se lava la columna con tampón S1 y se hace el seguimiento de la elución de las proteínas. La clostripaína y las proteínas de las colagenasas se recogen en fracciones separadas. La fracción de proteínas de colagenasas se concentra por diafiltración con HEPES 5 mM, CaCl₂ 1 mM de pH 7.5 (que en lo sucesivo se llamará también "tampón Q1").

Se separan las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II en un paso posterior de cromatografía preparativa con Q SEPHAROSE™. En primer lugar se lava la columna de Q SEPHAROSE™ con agua; después se pasa por la columna medio volumen de columna de HCl de guanidinio 4 M y después se sigue lavando con agua, cada paso con NaOH 0,5 M y HCl 0,5 M, después otro lavado con agua y finalmente se equilibra la columna con tampón Q1. Se introduce en la columna la fase líquida que contiene las proteínas de colagenasas obtenidas después de la cromatografía SP SEPHAROSE™. Se introducen en la columna 1-2 volúmenes de columna de tampón Q1 y se descarta el líquido eluido. Se eluyen por separado las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II aplicando un gradiente de concentración formado por 25 volúmenes de columna, empezando con una proporción del 95% de tampón Q1, un 5% de tampón Q2 (HEPES 5 mM, CaCl₂ 35 mM de pH 7,5) y terminando con una proporción del 5% de tampón Q1 y un 95% de tampón Q2. Se hace el seguimiento de la elución de las proteínas. Se recogen las proteínas de las colagenasas de tipo I y II en fracciones separadas y se verifican mediante un análisis HPLC (ver ejemplo 5).

Ejemplo 8

Determinación cuantitativa de la proporción entre las proteínas colagenasa de tipo II y de tipo I después de la purificación con Red SEPHAROSE™ FAST FLOW

Se purifican las proteínas de colagenasas de tipo I y II con arreglo al método del ejemplo 7. Los análisis con MONO-Q™ se realizan del modo descrito en el ejemplo 5. Se cuantifican las integrales de la superficie alojada debajo de los picos correspondientes a las proteínas de colagenasas de tipo I y II proteínas. Para ello, en la figura 3 se representa un cromatograma ilustrativo. La cuantificación de la superficie albergada debajo de los picos se recoge en la tabla 1.

Tabla 1. Cuantificación de las áreas de los picos de las colagenasas de tipo I y II

nº	tiempo de retención, min	área mAU*min	área/área de pico (tiempo) %
1	0,81	2,6433	0,87
2	1,64	2,0993	0,69
3	8,16	85,4644	28,13
4	9,75	31,2364	10,28
5	12,35	10,0797	3,32
6	15,87	30,8374	10,15
7	16,47	90,2817	29,71
8	17,54	36,8901	12,14
9	21,39	6,4197	2,11
10	23,98	6,3435	2,09
11	24,63	1,5335	0,50
			Σ 99,99

El área total del pico de la proteína de colagenasa de tipo II se obtiene en el intervalo comprendido entre 7,29 min y 9,75 min y supone el 28,1 % del área total del pico.

No se toma en consideración el pico del intervalo entre 9,75 min y 12,35 min supone el 10.3% del área total del pico. El análisis por espectrometría de masas indica que esta área de pico corresponde a una mezcla de diferentes productos de degradación de la colagenasa de tipo I y varias proteínas de no colagenasas.

El área total del pico de la proteína de colagenasa de tipo I se obtiene en el intervalo entre 14,36 min y 15,87 min y supone el 10,2% del área total del pico. Los productos de degradación se detectan en el intervalo de 15,87 min a 17,54 min (29,7%), y de 17,54 min y 19,61 min (12,1 %). En su conjunto, el área del pico correspondiente a la colagenasa de tipo I supone un 52% del área total del pico.

La proporción entre las proteínas de colagenasa de tipo I y la de tipo II se sitúa por tanto en 52/28,1, que se aproxima al valor de 1,85.

A continuación se presenta un nuevo método y esquema de purificación de proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II, que supera en especial los efectos de degradación de las proteínas diana debidos a otras actividades proteolíticas.

Ejemplo 9

Precipitación de proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del líquido sobrenadante segregado del cultivo

Todos los pasos descritos a continuación se llevan a cabo a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C, a menos que se indique otra cosa. Se añade una cantidad medida de sulfato amónico sólido al líquido sobrenadante segregado del cultivo, obtenido por ultrafiltración de un cultivo líquido de *C. histolyticum* con un material de filtro de tipo ACROPAK™ 500 (ver ejemplo 1). Se añade gradualmente el sulfato amónico al líquido sobrenadante durante un período de tiempo comprendido entre 20 min y 30 min, y se disuelve por agitación hasta alcanzar una concentración final de 3,2 M. Una vez se ha disuelto por completo el sulfato amónico se deja formar el precipitado durante un tiempo de 10 min a 20 min. Seguidamente se aísla por centrifugación el material precipitado de la fase líquida restante. El precipitado aislado se disuelve de nuevo directamente para los pasos ulteriores de purificación (ver ejemplo 9) o bien se almacena entre 2 y 8°C como máximo durante 2 semanas o a -20°C durante más de 2 semanas.

Ejemplo 10

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

5 Se disuelve el precipitado aislado, obtenido por el procedimiento del ejemplo 9, en un tampón acuoso que contiene CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7 y se ajusta la conductividad de la solución con sulfato amónico a un valor en torno a 95 mS/cm. Se introduce la solución a una columna de cromatografía, cuya fase estacionaria es de tipo Phenyl SEPHAROSE™ 6 FAST FLOW (LOW SUB) (General Electric, GE 17-0965-04). Antes se equilibra la columna con un tampón que contiene (NH₄)₂SO₄ 0,6 M, CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7.

10 En el momento de introducir la mezcla de las proteínas de colagenasas en la columna se descarta el líquido eluido. A continuación se lava la fase estacionaria que retiene las proteínas de colagenasas empleando un tampón acuoso de lavado que contiene (NH₄)₂SO₄ 0,6 M, CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7, con lo cual la conductividad del tampón de lavado se sitúa en torno a 95 mS/cm. Normalmente para el paso de lavado se eluyen a través de la columna entre 10 y 15 volúmenes de columna de tampón de lavado. El tampón de lavado eluido se desecha.

15 Se separan las proteínas de colagenasas de la fase estacionaria realizando una elución isocrática con un tampón de elución formado por CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7, para ello se ajusta la conductividad del tampón de lavado con sulfato amónico a un valor de 76 mS/cm. A tal fin se pasan por la columna entre 15 y 20 volúmenes de columna de tampón de elución.

20 Como alternativa se efectúa la elución de gradiente empezando con CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7, para ello se ajusta la conductividad del tampón de lavado con sulfato amónico a un valor de 95 mS/cm ("tampón 1"). La concentración final del gradiente es de CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7 ("tampón 2"). El volumen total del gradiente es normalmente de 10 volúmenes de columna. Después de la elución de gradiente se eluye la columna con otros 10 volúmenes de columna de tampón 2.

25 El líquido eluido o las fracciones reunidas del líquido eluido que contienen las proteínas de colagenasas se somete(n) seguidamente a una concentración y diafiltración con CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7.

Ejemplo 11

30 Estabilidad de proteínas de colagenasas después de la cromatografía de interacción hidrófoba

35 Para los ensayos de estabilidad se emplean partes alícuotas de líquido eluido diafiltrado obtenido por el procedimiento del ejemplo 10. En la tabla 2 se presenta el efecto de la reducción de las actividades proteolíticas de la clostripaína y tríptica. Se obtienen resultados similares en tres lotes de preparación independiente después de la cromatografía de interacción hidrófoba y efectuando una elución isocrática. Si se compara con la del líquido sobrenadante del cultivo de *C. histolyticum*, la actividad proteolítica tríptica ("tríp.") se reduce en un factor de 100 a 400 y la actividad proteolítica de la clostripaína ("clos.") se reduce en un factor de 100 a 150.

40 Tabla 2: reducción de actividades proteolíticas no deseadas

lote de preparación	1		2		3	
actividades proteolíticas	clos.	tríp.	clos.	tríp.	clos.	tríp.
factor de reducción	100	385	150	208	90	100

45 La estabilidad de las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II en la preparación de este apartado ya era muy elevada. Los análisis con MONO-Q™ se efectúan del modo descrito en el ejemplo 5 para caracterizar el o los líquidos eluidos. En la figura 1 se presentan cuatro cromatogramas superpuestos. Se comparan las muestras analizadas directamente después de la cromatografía de interacción hidrófoba y de una incubación de 2 d, 3 d y 6 d a 4°C. De la figura 1 se desprende que el pico principal correspondiente a la proteína colagenasa de tipo II no cambia de forma acusada en altura y la integral del área albergada debajo del pico no cambia de modo detectable. Tomando como referencia (100%) la integral del área debajo del pico principal correspondiente a la proteína de la colagenasa de tipo I en el día 0 d, se observa solamente una ligera disminución gradual después del día 2 d (aprox. un 99%), 3 d (aprox. 98%) y 6 d (aprox. 85%). Sin embargo, incluso después de 6 días, la mayor parte de la proteína colagenasa total del tipo I continúa estando aproximadamente intacta, como pone de manifiesto la integral del área albergada debajo del pico.

55 Este resultado inesperado demuestra que la mayor parte de las actividades proteolíticas no deseadas, que conducen a la pérdida o la reducción de las proteínas deseadas, ya se ha eliminado en este paso del esquema de purificación. La eliminación temprana de las actividades proteolíticas indeseables ha demostrado ser crucial para la ulterior optimización de la recuperación de la proteína colagenasa de tipo I.

Ejemplo 12

Determinación cuantitativa de la proporción entre las proteínas de colagenasa de tipo II y de tipo I después de la cromatografía de interacción hidrófoba

Después de la cromatografía de interacción hidrófoba descrita en el ejemplo 10 se determina la proporción entre las proteínas de colagenasas de tipo I y II. Se realiza un análisis MONO-Q™ del modo descrito en el ejemplo 5. Se cuantifican las integrales de la superficie de los picos correspondientes a las colagenasas de tipo I y II. A tal fin, en la figura 2 se presenta un cromatograma ilustrativo. La cuantificación de la superficie de los picos se recoge en la tabla 3.

Tabla 3: Cuantificación de las áreas de los picos de las colagenasas de tipo I y II

nº	tiempo de retención, min	área mAU*min	área/área de pico (tiempo) %
1	0,79	4,1512	0,38
2	7,90	12,1344	1,10
3	8,49	336,0089	30,40
4	9,21	49,1216	4,44
5	15,65	509,8739	46,13
6	16,50	179,8359	16,27
7	23,89	14,1003	1,28
			Σ 100

El área total del pico de la proteína de colagenasa de tipo II se obtiene en el intervalo comprendido entre 7,90 min y 9,21 min y supone el 30,4 % del área total del pico.

La superficie total del pico de la proteína colagenasa intacta de tipo I se obtiene en el intervalo entre 14,79 min y 16,50 min y supone el 46,1 % de la superficie total del pico. Debido al ataque proteolítico hay formas adicionales recortadas en el extremo C de la proteína colagenasa de tipo I en el intervalo entre 16,50 min y 19,00 min que suponen un 16,3% de la superficie total del pico. Por consiguiente, la suma de las áreas del pico de la proteína colagenasa de tipo I es del 62,4%.

La proporción entre la proteína colagenasa de tipo I y la de tipo II equivale por tanto a 62,4/30,4 que se aproxima al valor 2.

Ejemplo 13

Cromatografía de intercambio catiónico

Las actividades proteolíticas residuales de clostripaína y otras no deseadas se eliminan de la mezcla de proteínas de colagenasas de tipo I y II obtenidas por el procedimiento descrito en el ejemplo 10 mediante la cromatografía de intercambio catiónico. Se equilibra la columna de cromatografía de intercambio catiónico (resina SP SEPHAROSE™ FAST FLOW, Amersham Biosciences) con un tampón acuoso que contiene CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7. Se introduce el eluido del líquido diafiltrado obtenido en el ejemplo 10 en la columna cromatográfica y se cromatografían las proteínas de las colagenasas de tipo I y II a través de la fase estacionaria empleando un tampón de equilibrado como fase móvil. Se recogen las fracciones del líquido eluido de la columna. Se reúnen las fracciones que contienen actividad de colagenasa (ver ensayo del ejemplo 2).

Ejemplo 14

Separación de proteínas de colagenasas de tipo I y tipo II por cromatografía de intercambio aniónico

Se separan las proteínas de colagenasas purificadas obtenidas en el procedimiento del ejemplo 13 en las proteínas de colagenasas de tipo I y tipo II. Se equilibra la columna Q SEPHAROSE™ FAST FLOW de la cromatografía de intercambio aniónico con un tampón acuoso que contiene CaCl₂ 5 mM, HEPES 20 mM de pH 7. Se introduce en la columna la mezcla que contiene las proteínas de las colagenasas de tipo I y II obtenidas después del paso de purificación del ejemplo 13 y se adsorbe en la fase estacionaria. A continuación se efectúa un paso de lavado, eluyendo 3 volúmenes de columna del tampón de equilibrado por la columna. La elución se realiza pasando 25 volúmenes de columna de un gradiente de concentración lineal de iones Ca²⁺. La elución se inicia con CaCl₂ 5 mM, HEPES 5 mM de pH 7,5 ("tampón I") y finaliza con CaCl₂ 35 mM, HEPES 5 mM de pH 7,5 ("tampón II"). Las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II se obtienen en fracciones separadas. La colagenasa de tipo I se eluye en una proporción de tampón I/tampón II aprox. entre 44%/56% y 6%/94%; la colagenasa de tipo II se eluye en una proporción de tampón I/tampón II aprox. entre 76%/24% y 67%/33%.

Ejemplo 15

Determinación de aminoácidos N-terminales de proteínas de colagenasas purificadas de tipo I y tipo II

5 Las proteínas de colagenasas de tipo I y tipo II obtenidas por separado (ver ejemplo 14) se someten a la secuenciación N-terminal de aminoácidos mediante la degradación de Edman y análisis empleando un secuenciador de tipo PROCISE® (Applied Biosystems).

10 Para la isoforma de la proteína correspondiente al tipo de proteína de colagenasa de tipo I más abundante de la preparación de colagenasa de tipo I, se detecta la secuencia N-terminal I-A-N-T-N-S.

15 Para la isoforma de la proteína correspondiente al tipo de proteína de colagenasa de tipo II más abundante de la preparación de colagenasa de tipo II se detecta la secuencia N-terminal V-Q-N-E-S-K.

Ejemplo 16

Comparación de esquemas de purificación con respecto a la reducción de clostripaína

20 Se detecta la actividad de la clostripaína del modo descrito en el ejemplo 3. Las colagenasas de tipo I y de tipo II se aíslan por separado a partir de varios lotes de líquido sobrenadante del cultivo aplicando los procedimientos del ejemplo 9 al ejemplo 14 (preparaciones "A") y los del ejemplo 7 (preparaciones "B"). Se comparan las preparaciones con respecto a la actividad residual de clostripaína de dichas preparaciones. Los resultados se recogen en la tabla 4.

25 Tabla 4: Actividad de clostripaína en U/mg de proteína

lote nº	1	2	3	4	5	6	7	∅
col. I (A)				0,01	0,017	0,023	0,027	0,019
col. I (B)		0,04	0,11					0,075
col. II (A)				0,042	0,059	0,049	0,051	0,053
col. II (B)	0,09	0,3	0,07					0,153
col. = colagenasa								
∅ = promedio								

30 Estos datos siguen ilustrando la eliminación eficaz de la actividad de clostripaína de las preparaciones "A". Como resultado de ello se reduce significativamente la degradación de la enzima colagenasa deseada correspondiente y proporciona una base para mejorar la calidad de las preparaciones enzimáticas.

Ejemplo 17

Determinación de la actividad trípica de preparaciones de colagenasa de tipo I y tipo II

35 Se detecta la actividad de la tripsina del modo descrito en el ejemplo 4. Se aíslan las colagenasas de tipo I y de tipo II por separado de varios lotes de líquido sobrenadante del cultivo aplicando los procedimientos del ejemplo 9 al ejemplo 14 (preparaciones "A"). Se analizan las preparaciones para determinar la actividad residual de tripsina de las mismas. Los resultados se recogen en la tabla 5.

40 Tabla 5: Actividad de tripsina en U/mg de proteína

lote nº	4	5	6	7	∅
col. I (A)	0,00014	0,00015	0,00021	0,00013	0,00016
col. I (B)	0,00053	0,001	0,00064	0,0004	0,00064
col. = colagenasa					
∅ = promedio					

45 Estos datos siguen ilustrando la eliminación eficaz de la actividad de clostripaína de las preparaciones "A". Como resultado de ello se reduce significativamente la degradación de la enzima colagenasa deseada correspondiente y proporciona una base para mejorar la calidad de las preparaciones enzimáticas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del *Clostridium histolyticum* a partir de una mezcla compleja, que consta de los pasos siguientes:
- 5 (a) preparar la mezcla compleja disuelta en una fase líquida acuosa;
 (b) formar un precipitado de proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II disolviendo el sulfato amónico en la fase líquida del paso (a);
 (c) separar el precipitado del paso (b) de la fase líquida;
 10 (d) disolver el precipitado del paso (c) en un tampón acuoso que contiene iones Ca^{2+} y tiene un pH entre 6,0 y 8,0, y ajustar la conductividad del tampón con el precipitado disuelto a un valor comprendido entre 50 y 300 mS/cm, formándose una solución compleja tamponada que contiene las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II;
 (e) extraer la solución compleja tamponada del paso (d) poniéndola en contacto con una fase estacionaria hidrófoba y adsorbiendo las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II sobre la fase estacionaria;
 15 (f) separar la fase estacionaria hidrófoba junto con las proteínas de colagenasas adsorbidas de tipo I y de tipo II del paso (e) de la solución extraída;
 (g) eluir las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II de la fase estacionaria del paso (f);
 purificando de este modo las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, caracterizado porque después del paso (c) en el material susceptible de disolución del precipitado se reduce la actividad proteolítica de la clostripaína en un factor de 90 a 150 y se reduce la actividad triptica en un factor de 100 a 400, referido a las actividades proteolíticas respectivas de la mezcla compleja disuelta del paso (a).
- 25 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II del paso (g) se siguen purificando por cromatografía de intercambio catiónico, con lo cual se sigue separando la actividad proteolítica residual de las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II.
- 30 4. El método según la reivindicación 3, caracterizado porque las proteínas de tipo I y tipo II obtenidas después de la cromatografía de intercambio catiónico se separan ejecutando los pasos siguientes:
- (A) poner en contacto las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II purificadas adicionalmente con una fase estacionaria de intercambio aniónico, y adsorber las proteínas de colagenasas de tipo I y de tipo II sobre la fase estacionaria;
 35 (B) eluir, en fracciones separadas, las proteínas de la colagenasa de tipo I y la colagenasa de tipo II a partir de la fase estacionaria del paso (A);
- con lo cual se purifican por separado las proteínas de la colagenasa de tipo I y la colagenasa de tipo II.
- 40 5. El método según la reivindicación 4, caracterizado porque aprox. el 82% de la proteína de colagenasa de tipo I de la fracción de colagenasa de tipo I obtenida en el paso (B) tiene un peso molecular de aprox. 114 kDa.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado porque aprox. el 82% de la proteína de colagenasa de tipo I de la fracción de colagenasa de tipo I obtenida en el paso (B) está intacta en su extremo N.
- 45 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 4 a 6, caracterizado porque la actividad de clostripaína de la fracción de colagenasa de tipo I obtenida en el paso (B) es menor que aprox. 0,04 U/mg de proteína.
8. El método según la reivindicación 4, caracterizado porque aprox. el 93% de la proteína de colagenasa de tipo II de la fracción de colagenasa de tipo II obtenida en el paso (B) tiene un peso molecular de aprox. 112 kDa.
- 50 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 8, caracterizado porque aprox. el 93% de la proteína de colagenasa de tipo II de la fracción de colagenasa de tipo II obtenida en el paso (B) está intacta en su extremo N.
- 55 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 8 y 9, caracterizado porque la actividad de clostripaína de la fracción de colagenasa de tipo II obtenida en el paso (B) es menor que aprox. 0,07 U/mg de proteína.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 4 a 7, caracterizado porque en un paso posterior se mezclan una primera cantidad medida de la proteína de colagenasa de tipo I de la fracción de colagenasa de tipo I obtenida en el paso (B) y una segunda cantidad medida de proteína de colagenasa de tipo II.
- 60 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 8 y 9, caracterizado porque en un paso posterior se mezclan una primera cantidad medida de la proteína de colagenasa de tipo II de la fracción de colagenasa de tipo II obtenida en el paso (B) y una segunda cantidad medida de proteína de colagenasa de tipo I.

Fig. 1

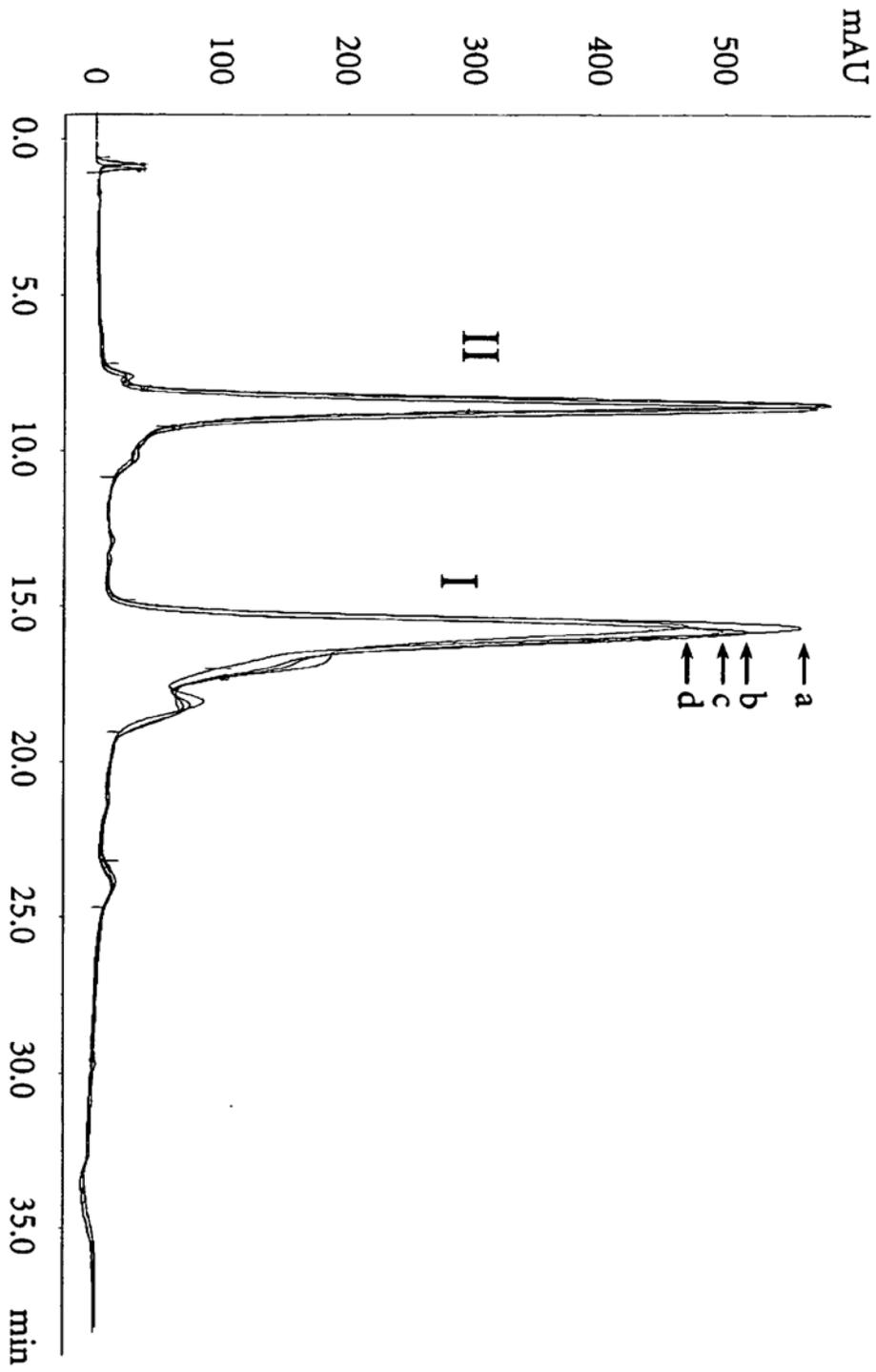


Fig. 2

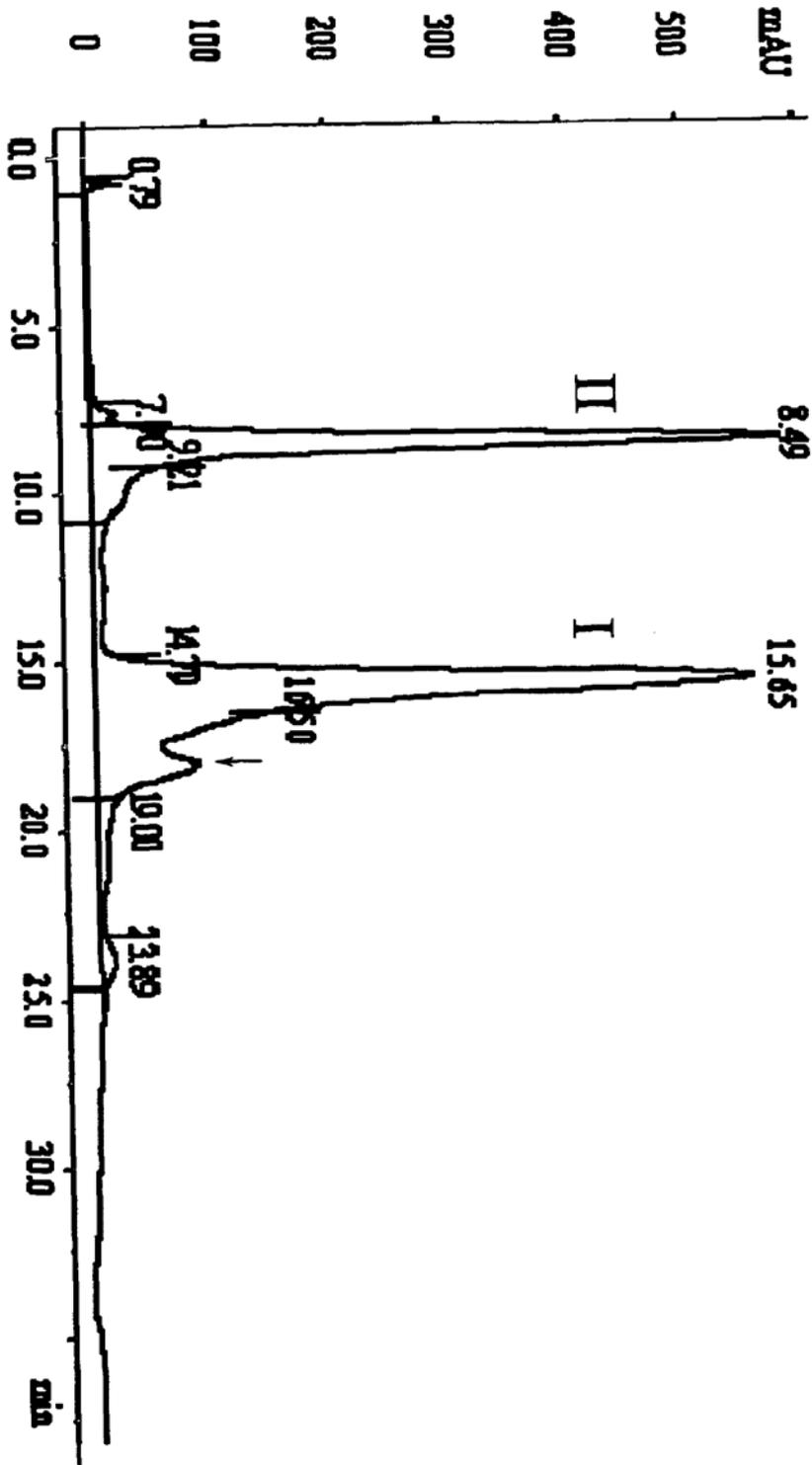


Fig. 3

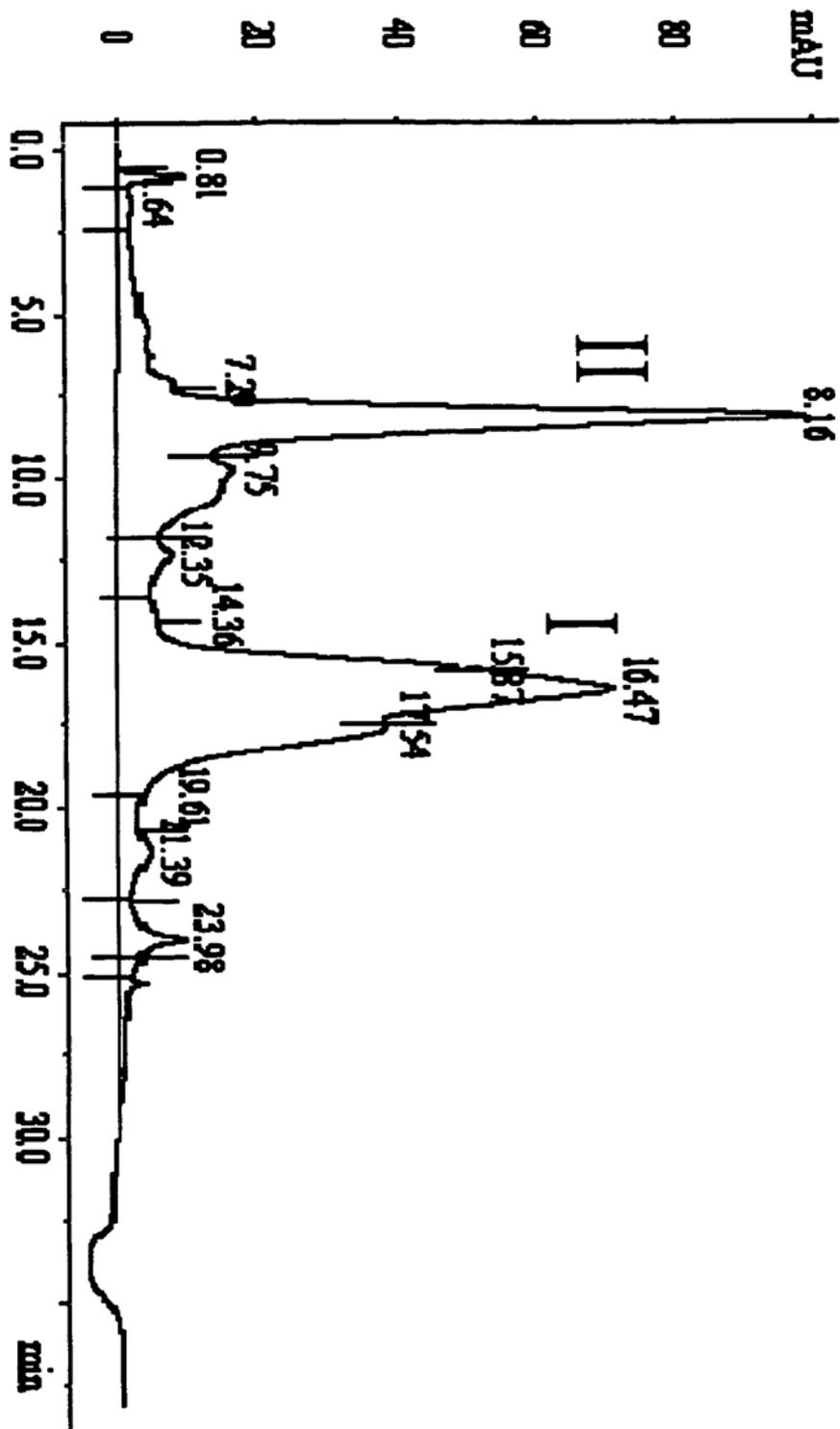


Fig. 4

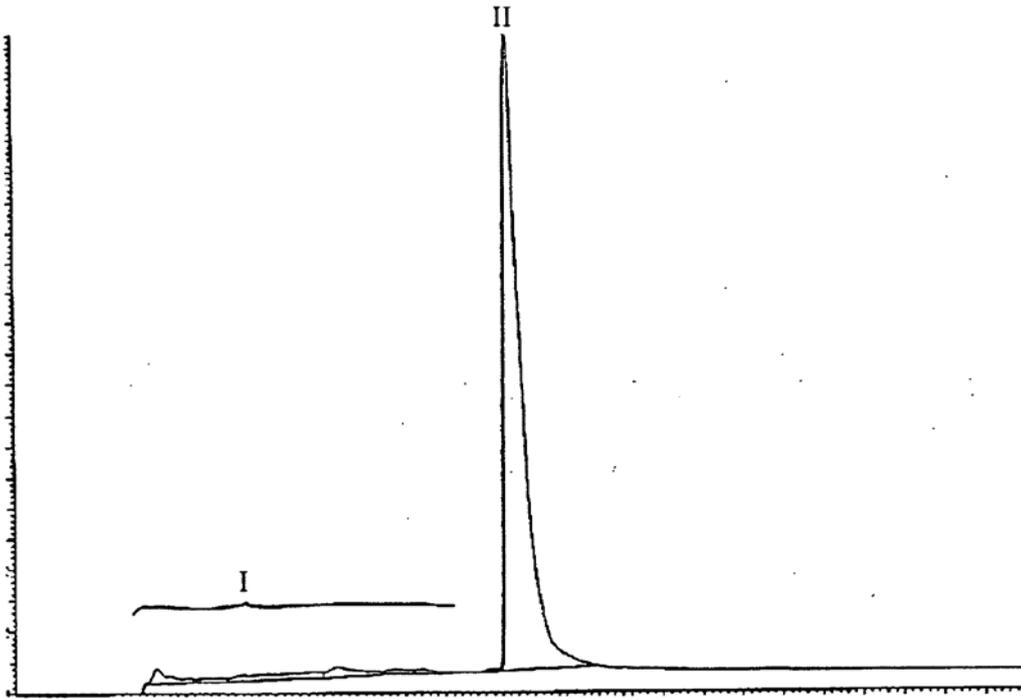


Fig. 5

