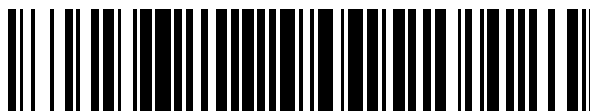


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 810**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/50** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

**A61K 38/46** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

**A61K 36/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05804486 .8**

96 Fecha de presentación: **22.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1824775**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Composición de desbridamiento a partir de bromelaína y procedimientos de producción de la misma**

30 Prioridad:  
**22.11.2004 IL 16533404**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.10.2012**

73 Titular/es:  
**MEDIWOUND, LTD. (100.0%)**  
**42 HAYARKON STREET, NORTHERN**  
**INDUSTRIAL ZONE**  
**YAVNE 81227, IL**

72 Inventor/es:  
**GORECKI, MARIAN y**  
**TOREN, AMIR**

74 Agente/Representante:  
**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

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).

ES 2 389 810 T3

## DESCRIPCIÓN

Composición de desbridamiento a partir de bromelaína y procedimientos de producción de la misma

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína y a los procedimientos para producir la misma. Particularmente, la presente invención se refiere a una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína que comprende enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando esencialmente desprovista de inhibidores de bromelaína, y a composiciones farmacéuticas que comprenden la misma. Las composiciones de desbridamiento y las composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas son particularmente útiles en el desbridamiento de tejidos con escaras y en la cicatrización de heridas.

**Antecedentes de la invención**

Se ha realizado un considerable esfuerzo para desarrollar preparaciones de desbridamiento que sean capaces de eliminar el tejido desvitalizado sin cirugía. El tejido desvitalizado se forma en todos los procesos patológicos que están asociados con un traumatismo epitelial, tales como úlceras de decúbito, necrosis por presión, incisiones y quemaduras. Un desbridamiento eficaz es esencial dado que el tejido desvitalizado es un excelente medio de cultivo para infecciones oportunistas. La septicemia resultante de las infecciones es la principal causa de muerte en la mayoría de los pacientes con quemaduras graves.

El uso de enzimas proteolíticas y de agentes químicos para efectuar un desbridamiento temprano del tejido desvitalizado no ha dado lugar a un desbridamiento satisfactorio. Se encontró que los agentes químicos tales como el ácido tánico, el ácido salicílico y el ácido pirúvico causaban un daño adicional a los tejidos ya lesionados.

Se han descrito enzimas proteolíticas, incluyendo, pinguinaina, tripsina, fibrinolisisina y estreptocinasa como agentes de desbridamiento. La patente de EE.UU. nº 5.505.943 desvela composiciones que contienen una proteasa producida por microorganismos del género *Vibrio* para tratar heridas hidrolizando los componentes del tejido necrótico.

Sin embargo, el desbridamiento con enzimas proteolíticas purificadas adolece de diversos inconvenientes, ya que las enzimas purificadas requieren numerosas aplicaciones durante un largo periodo de tiempo, muestran poca eficacia, tienen efectos secundarios tóxicos y no tienen selectividad.

Se ha averiguado que los extractos derivados del tallo de la planta de la piña (*Ananas comosus*) eliminan selectivamente el tejido desvitalizado. Dichos extractos, también denominados bromelaína, contienen varias enzimas proteolíticas e hidrolíticas.

La patente de EE.UU. nº 4.197.291 desvela un producto enzimático obtenido a partir de bromelaína capaz del desbridamiento de tejido desvitalizado de un hospedador mamífero, el producto enzimático comprende una proteína termolábil soluble en agua que está exenta de actividad caseinolítica y tiene un pKa del punto isoeléctrico de aproximadamente 6. La proteína comprende al menos dos subunidades, teniendo cada una de ellas un peso molecular desde aproximadamente 14,3 hasta 15 kDa, con un pico de absorción característico en la región ultravioleta del espectro a 280 nm. El procedimiento para preparar dicho producto enzimático según se desvela en la patente de EE.UU. nº 4.197.291 comprende la precipitación de la proteína con acetona, la extracción del precipitado con un tampón de acetato que contiene ácido tioglicólico, la filtración de la disolución a través de una membrana con un corte de peso molecular de aproximadamente 50 kDa, la filtración en gel del filtrado y un isoelectroenfoque. El producto enzimático así preparado contiene al menos dos, más probablemente tres, subunidades con un peso molecular desde 14,3 hasta 15 kDa. La patente de EE.UU. nº 4.226.854 desvela un procedimiento para el desbridamiento de tejido desvitalizado usando el producto enzimático desvelado en la patente de EE.UU. nº 4.197.291.

La patente de EE.UU. nº 4.329.430 desvela adicionalmente una mezcla de enzimas proteolíticas derivada de la bromelaína útil para diseccionar y digerir tejido desvitalizado. La mezcla de enzimas proteolíticas, que es termolábil y soluble en agua, contiene escarasa, una enzima hidrolítica exenta de actividad caseinolítica con un punto isoeléctrico de aproximadamente 6, que comprende al menos dos subunidades, cada una de las cuales tiene un peso molecular desde aproximadamente 14,3 hasta 50 kDa, ya que la mezcla enzimática se filtra a través de una membrana con un corte de peso molecular de 50 kDa y se concentra sobre una membrana con un corte de peso molecular de 30 kDa. Los resultados reproducibles obtenidos con la mezcla de enzimas proteolíticas son debidos aparentemente al hecho de que la mezcla enzimática no contiene un inhibidor, que aparentemente estaba presente en las preparaciones de enzimas proteolíticas publicadas previamente. Sin embargo, no hay ningún criterio para la detección de la actividad de este inhibidor.

La patente de EE.UU. nº 4.307.081 desvela un procedimiento para diseccionar y digerir tejido desvitalizado, que comprende poner en contacto el tejido con la mezcla de enzimas proteolíticas desvelada en la patente de EE.UU. nº 4.329.430.

La planta de la piña ha sido la fuente de diversas enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.106.621 desvela proteinasas de cisteína purificadas derivadas de material de la planta de la piña con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa y que muestran actividad frente a un sustrato de cumarilamida. Particularmente, la patente de EE.UU. nº 5.106.621 se refiere a las proteinasas de cisteína ananaína y comosaína, que muestran diferentes características físicoquímicas que las distinguen de la bromelaína del tallo. Una proteasa purificada activada por tiol con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa a 21 kDa, denominada  $\alpha$ -bromelaína, se desvela en la patente de EE.UU. nº 5.387.517, y se muestra que tiene actividad de desbridamiento. Además, la bromelaína contiene una fosfatasa ácida y una peroxidasa, y puede contener actividad de amilasa y de celulasa. La patente de EE.UU. nº 6.335.427 enseña la purificación de una proteína de 25 kDa a partir de bromelaína, se ha encontrado que la proteína tiene actividad antineoplásica.

Perlstein y Kezdy (J. Supramol. Struct. 1: 249-254, 1973) identificaron siete inhibidores de la proteasa estrechamente relacionados, es decir, los inhibidores de la bromelaína I-VII, a partir de un polvo comercial de acetona de bromelaína. Se demostró que los inhibidores tenían unos pesos moleculares de 5000 - 6000 Dalton y que contenían 50 residuos de aminoácidos y cinco puentes de disulfuro (Perlstein y Kezdy, *ibid*). El análisis de la estructura primaria de uno de los siete inhibidores reveló una amplia microheterogeneidad (Reddy, M. N. y col. J. Biol. Chem. 250: 1741-1750, 1975).

La patente de EE.UU. nº 5.830.739 desvela procedimientos para preparar una mezcla estable de escarasa y otras enzimas proteolíticas a partir de bromelaína, que comprende extraer la bromelaína con una disolución diluida de ácido ascórbico, seguido de la precipitación de la escarasa y otras enzimas proteolíticas con sulfato amónico. La patente de EE.UU. nº 5.830.739 enseña adicionalmente que el precipitado de sulfato amónico puede lavarse con agua destilada sobre un ultrafiltro de 10 kDa. Se encuentra que el procedimiento para preparar la mezcla estable de escarasa rinde mayores cantidades de escarasa. Sin embargo, no hay ninguna indicación de que la mezcla esté desprovista de inhibidores de la bromelaína.

Se encontró que las distintas enzimas purificadas aisladas a partir de bromelaína no eran tan eficaces en el desbridamiento de tejidos no viables como la mezcla de enzimas proteolíticas obtenida a partir de la bromelaína. Sin embargo, se encontró que la mezcla de enzimas proteolíticas obtenida a partir de la bromelaína, que contiene proteínas con unos pesos moleculares de hasta 50 kDa, incluyendo inhibidores de la bromelaína, no era tan eficaz en el desbridamiento de tejidos no viables como una mezcla enzimática obtenida a partir de bromelaína que contenía proteínas con unos pesos moleculares de 30 a 50 kDa, que presumiblemente estaba desprovista de los inhibidores.

Dado que dichas mezclas enzimáticas están destinadas al uso clínico en seres humanos, existe una necesidad no satisfecha de obtener una mezcla enzimática caracterizada bioquímicamente a partir de bromelaína, que tenga unas características bioquímicas distintas y reproducibles, esencialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína y que contenga la mayoría de las enzimas proteolíticas de la bromelaína, de forma que se obtenga un desbridamiento eficaz de los tejidos no viables.

### **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína capaz del desbridamiento de tejidos no viables y con unas características bioquímicas distintivas. Particularmente, la presente invención proporciona una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína, caracterizada bioquímicamente por estar esencialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína a la vez que comprende la mayoría de las enzimas proteolíticas de la bromelaína. La composición enzimática así obtenida es muy eficaz en el desbridamiento de tejidos no viables.

Por primera vez se desvela ahora que una composición enzimática obtenida a partir de bromelaína con la mayoría de las enzimas proteolíticas de la bromelaína, pero esencialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína, tiene una actividad de desbridamiento superior a la de la bromelaína. En este documento se desvela a continuación que, mientras que la bromelaína contiene al menos tres picos proteicos principales con unos pesos moleculares de aproximadamente 6, 17,5 y 23 kDa cuando se eluyen desde una columna de HPLC de exclusión por tamaños, la composición enzimática de la presente invención comprende predominantemente un pico proteico con un peso molecular de aproximadamente 23 kDa cuando se aplica a la misma columna de HPLC de exclusión por tamaños. La composición enzimática es muy reproducible en su contenido proteico, y por lo tanto es ventajosa para su uso clínico.

El procedimiento para preparar la composición enzimática según la presente invención comprende las etapas de extraer polvo de bromelaína disponible comercialmente con una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante, añadir un coadyuvante de filtrado, filtrar la suspensión con objeto de eliminar los componentes insolubles, precipitar las enzimas proteolíticas añadiendo una sal de sulfato amónico la disolución, disolver el precipitado de sulfato amónico con una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante, y filtrar la disolución, de forma que se retengan las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa.

Según un aspecto, la presente invención proporciona una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína, comprendiendo la composición de desbridamiento enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando dicha composición sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína. El término "sustancialmente desprovista" se refiere a composiciones que comprenden como mucho cantidades residuales de inhibidores de la bromelaína en comparación con la cantidad presente en los extractos brutos de bromelaína.

Según algunas formas de realización, los inhibidores de la bromelaína son menos del 10% p/p del contenido proteico de la composición de desbridamiento. Preferiblemente, los inhibidores de la bromelaína son menos del 5% p/p del contenido proteico de la composición de desbridamiento, más preferiblemente los inhibidores de la bromelaína son menos del 2% p/p del contenido proteico de la composición de desbridamiento, y muy preferiblemente los inhibidores de la bromelaína son menos del 1% p/p del contenido proteico de la composición de desbridamiento.

Según una forma de realización adicional, una composición de desbridamiento consiste esencialmente en un único pico proteico tras una elución desde una columna de HPLC de exclusión por tamaños TSK-Gel 3000<sub>SWXL</sub>, constituyendo el único pico proteico proteínas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa.

Según formas de realización aún más adicionales, el único pico proteico se obtiene con un rendimiento de al menos el 50% p/p del contenido proteico de la composición de desbridamiento aplicada a la columna de HPLC de exclusión por tamaños. Según otra forma de realización, el principal pico proteico se obtiene con un rendimiento de al menos el 60% p/p del contenido proteico de la composición de desbridamiento. Según una forma de realización adicional, el principal pico proteico se obtiene con un rendimiento de al menos el 70% p/p del contenido proteico de la composición de desbridamiento aplicada a la columna.

Según formas de realización adicionales, la composición desbridamiento obtenida a partir de bromelaína según los principios de la presente invención comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener una composición de desbridamiento a partir de bromelaína, comprendiendo la composición de desbridamiento enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando dicha composición sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

- (a) suspender la bromelaína en una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante, teniendo la disolución ácida un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;
- (b) ajustar la suspensión de (a) a un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;
- (c) añadir un coadyuvante de filtrado a la suspensión de (b);
- (d) filtrar la suspensión de (c) para eliminar los componentes insolubles;
- (e) añadir a la disolución filtrada de (d) una sal de sulfato amónico para conseguir una saturación de sulfato amónico en el intervalo desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 50%;
- (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4;
- (g) incubar la suspensión de (f) a 3°C - 10°C;
- (h) centrifugar la suspensión de (g) para conseguir un precipitado de sulfato amónico;
- (i) disolver el precipitado de sulfato amónico en una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante con un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;
- (j) filtrar la disolución de (i) de forma que se retengan las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa; y
- (k) liofilizar la disolución retenida de (j).

Según una forma de realización actualmente preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener una composición de desbridamiento a partir de bromelaína, comprendiendo la composición de desbridamiento enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando dicha composición sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

- (a) suspender la bromelaína en ácido acético 0,3 M que comprende un 1% de ácido ascórbico y n-octanol con un pH desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,6;
- (b) ajustar la suspensión de (a) a un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5;
- (c) añadir un coadyuvante de filtrado que comprende sílice a la suspensión de (b);
- (d) filtrar la suspensión de (c) a través de un filtro prensa para eliminar los componentes insolubles;
- (e) añadir a la disolución filtrada de (d) una sal de sulfato amónico (285 g/L) para conseguir una saturación del 40% de sulfato amónico;
- (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5;
- (g) incubar la suspensión de (f) durante aproximadamente 12 - 24 horas a 4°C;
- (h) centrifugar la suspensión de (g) para conseguir un precipitado de sulfato amónico;
- (i) disolver el precipitado de sulfato amónico en ácido acético 0,3 M que comprende un 1% de ácido ascórbico con un pH desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,6;
- (j) filtrar la disolución de (i) a través de un ultrafiltro de 10 kDa, de forma que se retengan las enzimas

proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa;  
 (k) filtrar la disolución retenida de (j) para conseguir una disolución estéril; y  
 (l) liofilizar la disolución filtrada de (k).

Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una composición de desbridamiento según los principios de la presente invención para la elaboración de un medicamento para tratar una herida mediante el desbridamiento de tejidos no viables.

Según las mismas formas de realización, puede tratarse una amplia variedad de heridas con la composición farmacéutica de la invención, incluyendo, pero no limitándose a, heridas por quemaduras con un espesor total y parcial, quemaduras solares, quemaduras por congelación; lesiones ulcerosas tales como úlceras de presión (decúbito) y varicosas, úlceras por estasis y tróficas; heridas asociadas a procedimientos quirúrgicos tales como amputación, incisión, circuncisión y episiotomía; heridas traumáticas y piógenas; vaginitis; cervicitis; heridas por quistes pilonidales; y tejido cicatrizal de cataratas. Las composiciones farmacéuticas de la invención también son útiles para la preparación de zonas de injertos cutáneos.

Estas y otras formas de realización de la presente invención se comprenderán mejor con relación a las figuras, descripción, ejemplos y reivindicaciones que siguen.

### **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 muestra un esquema del procedimiento para preparar Debrase a partir de bromelaína.

La FIG. 2 muestra un cromatograma de exclusión por tamaños de un extracto bruto de bromelaína. Se extrajo el polvo de bromelaína con tampón de fosfato a pH 6,1 saturado con fenilacetato de mercurio y se centrifugó. El sobrenadante se aplicó a una columna preparativa de HPLC de exclusión por tamaños y se eluyó con el mismo tampón. Se recogieron las fracciones. Los cuadrados representan la absorbancia a 280 nm y los círculos representan el % de inhibición de la actividad esterolítica de la Debrase.

La FIG. 3 muestra los cromatogramas de exclusión por tamaños de la Debrase (panel superior) y de la bromelaína (panel inferior). La bromelaína se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaños y aparecieron tres picos proteicos (es decir, los picos numerados con 1, 2 y 3) aproximadamente a los 32, 35 y 40 min, respectivamente (panel inferior). La Debrase se sometió a la misma cromatografía de exclusión por tamaños y sólo apareció un pico proteico aproximadamente a los 32 min (panel superior). Los picos nº 2 y 3, que aparecían en el cromatograma de la bromelaína, eran indetectables en el cromatograma de la Debrase. El pico nº 3 se identificó como el inhibidor de la bromelaína, y el pico nº 2 se consideró un contaminante o un inhibidor.

La FIG. 4 muestra la actividad de desbridamiento de dos preparaciones de Debrase sobre piel de oreja de cerdo. Se midió el tiempo hasta el desgarro en trozos de piel de oreja de cerdo en función de las concentraciones de Debrase.

La FIG. 5 muestra la actividad de desbridamiento de dos preparaciones de bromelaína sobre piel de oreja de cerdo. Se midió el tiempo hasta el desgarro en trozos de piel de oreja de cerdo en función de las concentraciones de bromelaína.

La FIG. 6 muestra la actividad de desbridamiento de Debrase y de bromelaína sobre piel de oreja de cerdo. Se midió el tiempo hasta el desgarro en trozos de piel de oreja de cerdo en función de las concentraciones de Debrase y bromelaína.

La FIG. 7 muestra una electroforesis bidimensional en gel de Debrase obtenida a partir de bromelaína. La Debrase se aisló a partir de la bromelaína (véase el Ejemplo 1 de este documento, a continuación) y se sometió a una electroforesis bidimensional en gel. Se identificaron cuatro manchas proteicas, designadas como 1 - 4, mediante un análisis por EM/EM.

La FIG. 8 muestra una electroforesis bidimensional en gel de una mezcla proteolítica obtenida a partir de bromelaína. Se preparó una mezcla proteolítica a partir de bromelaína según el procedimiento descrito en el documento US 5.830.739. La mezcla se sometió a una electroforesis bidimensional en gel, y se identificaron cinco manchas proteicas designadas como 5 - 9, mediante un análisis por EM/EM.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína, comprendiendo la composición enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína. La invención proporciona adicionalmente procedimientos para obtener dicha composición de desbridamiento y procedimientos de uso de la misma.

Ahora se desvela por primera vez que, combinando dos nuevas etapas, es decir, la adición de un coadyuvante de filtrado y la filtración, al procedimiento para preparar una mezcla proteolítica a partir de bromelaína según se desvela en la patente de EE.UU. nº 5.830.739, permite obtener una composición de desbridamiento con unas

características bioquímicas y biológicas mejoradas. La composición de desbridamiento de la presente invención contiene la mayoría de las enzimas proteolíticas de la bromelaína, es decir, enzimas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa, pero esencialmente desprovistas de proteínas de bajo peso molecular, es decir, de inhibidores de la bromelaína con unos pesos moleculares de aproximadamente 5 - 6 kDa. La composición

5 tiene una actividad de desbridamiento superior que la de la bromelaína y muestra un contenido proteico reproducible.

Según un aspecto, la presente invención proporciona una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína, comprendiendo la composición de desbridamiento enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, en la que dicha composición está sustancialmente desprovista de inhibidores de la

10 bromelaína.

Según se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "bromelaína" se refiere a cualquiera de las diversas preparaciones de bromelaína en polvo disponibles comercialmente actualmente. Algunos ejemplos de fabricantes de bromelaína incluyen, pero no se limitan a, Sigma and Challenge Bioproducts Co. Ltd., Taiwán. La bromelaína se prepara partir del tallo de la planta de la piña. Un procedimiento típico para obtener la bromelaína es como sigue: en primer lugar se ajusta el jugo del tallo de la planta de la piña a un pH de aproximadamente 3 ó 4 con ácido fosfórico, y se añade hidruro sódico o sulfhidrilo sódico para proteger frente a la oxidación por sulfhidrilo. El material inerte se precipita con aproximadamente un 30% de acetona, y tras la filtración, el fluido clarificado se precipita con acetona al 70%. Este precipitado se recoge mediante centrifugación y bien se redisuelve en agua que contiene hidruro o sulfhidrilo sódico que ha sido acidificado con ácido fosfórico y se vuelve a precipitar, o bien se seca a vacío directamente en un horno de vacío. Si el material se vuelve a precipitar, se utiliza acetona al 70%. El material seco de cualquiera de los procesos es adecuado como materia prima para obtener la composición de desbridamiento de la presente invención.

15 Se sugirió un procedimiento publicado previamente para obtener una mezcla proteolítica a partir de bromelaína, procedimiento que comprende una etapa de concentrar la disolución a través de membranas con un corte de 30 kDa, para eliminar los inhibidores de la bromelaína (véase la patente de EE.UU. nº 4.329.430). Sin embargo, como el procedimiento desvelado en la patente de EE.UU. nº 4.329.430 comprende la etapa de concentrar la disolución a través de membranas con un corte de 30 kDa, presumiblemente se eliminaron otras proteínas con unos pesos moleculares de hasta 30 kDa también por la concentración. Otro procedimiento publicado previamente comprende una etapa de filtrar el extracto a través de membranas con un corte de 10 kDa (véase la patente de EE.UU. nº 5.830.739), sin embargo no se proporcionó ninguna indicación sobre la ausencia de actividad del inhibidor de la bromelaína. Al contrario que la técnica anterior, la presente invención proporciona un medio para purificar

25 adicionalmente una composición de desbridamiento a partir de bromelaína y para caracterizar bioquímicamente la composición de desbridamiento. Como tal, la composición de desbridamiento obtenida según los principios de la presente invención demuestra estar sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína y es más activa en el desbridamiento de tejidos no viables que los procedimientos publicados previamente.

Los inhibidores de la bromelaína son polipéptidos con unos pesos moleculares de aproximadamente 5 - 6 kDa (véase, por ejemplo, Perlstein, S. H. y Kezdy, F. J., Supramol. Struct. 1: 249-254, 1973). Según los Ejemplos desvelados en este documento, a continuación, la composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína según los principios de la presente invención, comprende proteínas con unos pesos moleculares aparentes en un exceso de aproximadamente 10 kDa, composición que está esencialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína. El término "aproximadamente", cuando se refiere a un peso molecular de una proteína, pretende incluir 2 kDa por encima o por debajo del peso molecular de la proteína. Por ejemplo, si una proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, se entiende que el peso molecular de la proteína puede variar entre 8 kDa y 12 kDa.

45 El término "sustancialmente desprovista" se refiere a composiciones que comprenden como mucho cantidades residuales de inhibidores de la bromelaína en comparación con la cantidad presente en el extracto bruto de bromelaína, es decir, la materia prima a partir de la cual se obtiene la composición de desbridamiento de la invención. El término "cantidad residual", según se usa en este documento, pretende indicar que los inhibidores de la bromelaína constituyen no más del 10% p/p del contenido en proteína de la composición de desbridamiento. Preferiblemente, los inhibidores de la bromelaína constituyen no más del 5% p/p del contenido en proteína de la composición de desbridamiento, más preferiblemente no más del 2% p/p del contenido en proteína de la composición de desbridamiento, y muy preferiblemente no más del 1% p/p del contenido en proteína de la composición de desbridamiento.

55 Según otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener una composición de desbridamiento a partir de bromelaína, comprendiendo la composición enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando dicha composición sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

(a) suspender la bromelaína en una disolución ácida con un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;

60 (b) ajustar la suspensión de (a) a un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;

- (c) añadir un coadyuvante de filtrado a la suspensión de (b);
- (d) filtrar la suspensión de (c) para eliminar los componentes insolubles;
- (e) añadir a la disolución filtrada de (d) una sal de sulfato amónico para conseguir la saturación de sulfato amónico en el intervalo desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 50%;
- 5 (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4;
- (g) incubar la suspensión de (f) a 3°C - 10°C;
- (h) centrifugar la suspensión de (g) para conseguir un precipitado de sulfato amónico;
- (i) disolver el precipitado de sulfato amónico en una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante con un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;
- 10 (j) filtrar la disolución de (i) de forma que se retengan las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa; y
- (k) liofilizar la disolución retenida de (j).

Según la invención, la suspensión de la bromelaína se realiza en cualquier disolución ácida con un pH entre aproximadamente 2,4 y 4. Algunos ejemplos de disoluciones ácidas o tampones que pueden usarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido acético en agua, tampón de acetato y tampón de acetato que contiene un 1% de ácido tioglicólico, pH 2,4 - 4. Según algunas formas de realización ejemplares, la disolución ácida se elige de entre los tampones y las disoluciones desveladas en las Patentes de EE.UU. nº 5.830.739 y 4.197.291, cuyo contenido se incorpora como referencia como si se estableciera completamente en este documento.

La disolución ácida puede comprender opcionalmente un antioxidante. Algunos ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, ácido ascórbico, dihidroquinona, butilhidroxitolueno y ditiotreitol. El antioxidante puede añadirse a una concentración de aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 2%, preferiblemente al 1%.

La disolución ácida puede comprender adicionalmente un agente humectante. Un ejemplo de agente humectante incluye, pero no se limita a, n-octanol.

El pH de la disolución ácida, que opcionalmente comprende un antioxidante, debería estar en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4. Según una cierta forma de realización preferida, el pH de la disolución ácida, que opcionalmente comprende un antioxidante, varía desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,6. El término "aproximadamente", cuando se refiere a un pH de una disolución o suspensión, pretende indicar que 0,1 unidades de pH por encima o por debajo del pH indicado están en el ámbito de la presente invención.

Según la invención se añade un coadyuvante de filtrado a la suspensión de (a). Según una forma de realización, el coadyuvante de filtrado comprende sílice. Preferiblemente, el coadyuvante del filtrado es diatomitea natural que se calcina para conseguir unas tasas de flujo más rápidas.

La precipitación de las proteínas deseadas se realiza añadiendo a la disolución filtrada de la etapa (d) una sal de sulfato amónico. La sal de sulfato amónico puede añadirse para conseguir la saturación del sulfato amónico a un intervalo de entre aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 50%. Preferiblemente, la sal de sulfato amónico puede añadirse para conseguir una saturación del 40% de sulfato amónico.

La suspensión de la etapa (f) se incuba entonces a una temperatura entre 3°C y 10°C. Preferiblemente, la suspensión de la etapa (f) se incuba durante al menos 10 horas a unas temperaturas de entre 3°C y 10°C. Más preferiblemente, la suspensión de la etapa (f) se incuba durante 12 - 24 horas a 4°C.

Al final de la incubación, la suspensión de la etapa (g) se centrifuga para precipitar las proteínas deseadas, es decir, las enzimas proteolíticas. Entonces el precipitado se disuelve en una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante. Según una forma de realización ejemplar, la suspensión se incuba durante al menos 10 horas a 4°C.

La disolución de la etapa (i) se somete a una etapa de filtración para retener las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa. Según una forma de realización preferida, la disolución de la etapa (i) se filtra a través de un filtro de membrana con un corte de peso molecular de aproximadamente 10 kDa. Debe entenderse que cualquier membrana de filtro que sea capaz de eliminar inhibidores de la bromelaína y otros contaminantes reteniendo las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de 10 kDa está englobada en la presente invención.

La composición de desbridamiento puede ser liofilizada después de la filtración, puede lavarse con agua destilada y después liofilizarse o puede filtrarse y después liofilizarse. Según una forma de realización actualmente preferida, la composición de desbridamiento se filtra a través de una membrana de filtro con un tamaño de poro de al menos aproximadamente 0,5 µm para obtener una disolución estéril, que después se liofiliza y se almacena. Típicamente, la composición de desbridamiento se almacena en seco, ya que es menos estable en presencia de humedad. La composición desbridamiento se disuelve únicamente antes de su uso.

Según una forma de realización actualmente preferida, el procedimiento para obtener la composición de desbridamiento a partir de bromelaína comprende las siguientes etapas:

- (a) suspender la bromelaína en ácido acético 0,3 M que comprende un 1% de ácido ascórbico y n-octanol con un pH desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,6;
- (b) ajustar la suspensión de (a) para conseguir un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5;
- (c) añadir un coadyuvante de filtrado que comprende sílice a la suspensión de (b);
- (d) filtrar la suspensión de (c) a través de un filtro prensa para eliminar los componentes insolubles;
- (e) añadir a la disolución filtrada de (d) una sal de sulfato amónico (285 g/L) para conseguir una saturación del 40% de sulfato amónico;
- (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5;
- (g) incubar la suspensión de (f) durante aproximadamente 12 - 24 horas a 4°C;
- (h) centrifugar la suspensión de (g) para conseguir un precipitado de sulfato amónico;
- (i) disolver el precipitado de sulfato amónico en ácido acético 0,3 M que comprende un 1% de ácido ascórbico con un pH desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,6;
- (j) filtrar la disolución de (i) a través de un ultrafiltro de 10 kDa, de forma que se retengan las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente de 10 kDa;
- (k) filtrar la disolución retenida de (j) para conseguir una disolución estéril; y
- (l) liofilizar la disolución filtrada de (k).

#### Composición farmacéutica

La presente invención proporciona una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína, composición que comprende enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa, en la que dicha composición está esencialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína.

Según algunas formas de realización, la composición de desbridamiento de la presente invención puede comprender adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable para conseguir una composición farmacéutica.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que suministra los componentes activos al objetivo previsto y que no causa daño a los seres humanos u otros organismos receptores. Según se usa en este documento, se entenderá que "farmacéutico" engloba productos farmacéuticos tanto animales como humanos. Algunos portadores útiles incluyen, por ejemplo, agua, acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butan-1,3-diol, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo o aceite mineral. La metodología y los componentes para la formulación de composiciones farmacéuticas son bien conocidos, y pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimoctava edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co. Easton Pa., 1990.

La composición farmacéutica puede formularse de cualquier forma apropiada para su aplicación a los pacientes. La vía de administración preferida generalmente es mediante una aplicación tópica en la zona que se va a tratar. Consecuentemente, la composición farmacéutica puede formularse en una forma adecuada para su aplicación tópica, por ejemplo, en disoluciones, suspensiones, cremas, lociones, geles, espumas, aerosoles, polvo seco y similares. La composición farmacéutica puede aplicarse directamente sobre el tejido lesionado o puede aplicarse sobre un apósito inerte, tal como una almohadilla de gasa, y después aplicarse sobre el tejido lesionado.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender otros materiales opcionales, que pueden elegirse dependiendo del portador. Algunos componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a, conservantes tales como timerosal, alcohol bencílico o parabenos, agentes dispersantes tales como polietilenglicol, ácido hialurónico, carbapol o glicerol, agentes antimicrobianos tales como antibióticos o agentes antifúngicos, y sustancias incrementadoras del volumen tales como lactosa o manitol. Puede añadirse un agente queratinolítico para ayudar en la disección del tejido con escaras.

#### Uso terapéutico de la composición de desbridamiento

La presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de desbridamiento según los principios de la invención para la elaboración de un medicamento para tratar una herida mediante el desbridamiento de los tejidos no viables.

Según una forma de realización, el procedimiento para el desbridamiento de tejidos no viables comprende aplicar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de desbridamiento, en el que la composición de desbridamiento comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

La composición de desbridamiento de la invención es útil para tratar heridas. Particularmente, la composición de desbridamiento es útil en el desbridamiento de heridas y en aplicaciones para la curación de heridas. Las propiedades pueden demostrarse en varias situaciones de prueba, incluyendo ensayos clínicos con animales y con seres humanos. El ensayo usado más ampliamente es una herida de quemadura de espesor parcial en cerdos descrito por Mertz y col. (Journal Surgical Research (1990) 48: 245-248).

Para el desbridamiento de heridas, la eficacia se determina, entre otras indicaciones, por la ausencia, el ablandamiento o la disolución de la escara; la ausencia de hidrólisis de los componentes tisulares viables; y/o la

ausencia de irritación de la herida. Para la curación de heridas tópicas, la eficacia se determina, entre otras indicaciones, por la contracción de la herida, un incremento en la tasa de curación y/o una mejora en la curación (es decir, mantener la respuesta al estímulo táctil, menor fibrosis, mejora en la neovascularización, etc.). Por lo tanto, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de la composición de desbridamiento necesaria para eliminar o reducir el tejido con escaras y/o para promover la curación de la herida.

Puede tratarse una amplia variedad de heridas con la composición farmacéutica de la invención, incluyendo, pero no limitándose a, quemaduras de heridas de espesor parcial y total; lesiones ulcerosas, principalmente úlceras de presión (decúbito) y varicosas, úlceras por estasis y tróficas; heridas quirúrgicas tales como amputación, incisión, heridas traumáticas y piógenas; tratamiento de vaginitis, cervicitis, circuncisiones, episiotomía, heridas por quistes pilonidales, ántrax, quemaduras solares, quemaduras por congelación y tejido cicatrizal de cataratas.

El desbridamiento de tejidos no viables con las composiciones de desbridamiento o las composiciones farmacéuticas de la invención puede realizarse mediante una única aplicación sobre el tejido con escaras o mediante varias aplicaciones, siempre que se consiga el desbridamiento. El procedimiento de desbridamiento de tejidos con escaras según la presente invención puede realizarse en combinación con otros procedimientos de desbridamiento conocidos.

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar una comprensión más completa de la invención. Las técnicas, condiciones, materiales, proporciones y datos referidos específicos establecidos para ilustrar los principios de la invención son ejemplares y no deberían interpretarse como limitantes del ámbito de la invención.

### **Ejemplo 1**

#### **Preparación de la Debrase**

##### Suspensión de bromelaína

Se suspendió bromelaína SP (4 Kg de polvo; Challenge Byproducts Co. Ltd., Taiwán) en 40 litros de una disolución en suspensión que contenía ácido acético 0,3 M, ácido ascórbico al 1% y 70 mg/ml de n-octanol, pH 2,4 - 2,6 y una conductividad de 1,0 - 1,2 mS como sigue: la disolución en suspensión estaba recién preparada (no más de un día antes de su uso, y se enfrió previamente a 3 - 5°C. Se añadió lentamente la bromelaína a la disolución en suspensión previamente enfriada, con agitación. Después de 10 min se midió el pH de la suspensión y se ajustó a 2,5 - 3,5 con ácido acético 1 M o con hidróxido sódico 0,1 M. La suspensión se agitó de forma continua a 3 - 5°C, hasta el día siguiente (FIG. 1).

##### Filtración a través de un filtro prensa

Tras la incubación hasta el día siguiente, la suspensión se diluyó con un volumen igual de una disolución diluida que contiene ácido acético 0,3 M y ácido ascórbico al 1% (pH 2,4 - 2,6). Se añadió lentamente un coadyuvante de filtrado Celite Hyflo (60 g/L; Merck, Alemania), a la suspensión diluida, con agitación continua durante al menos 15 min. La suspensión se filtró entonces a través de un filtro prensa (Celatom, Difenbach, Italia) equipado con almohadillas filtrantes IF 350 y CRESASTE 110 (Indastrialfiltro, Italia) para eliminar los componentes insolubles. Después de la primera ronda de filtrado, la disolución proteica (filtrado) se recirculó a través del filtro prensa, y el filtrado transparente se recogió y se enfrió previamente a 3 - 5°C. Al final de la filtración, el filtro prensa se lavó con aproximadamente 20 L de la disolución diluida y se purgó con aire para eliminar las proteínas residuales del filtro. La disolución que contenía las proteínas residuales del filtro se combinó con el filtrado y se agitó de forma continua a 4 - 6°C.

##### Precipitación con sulfato amónico

Se añadió lentamente sulfato amónico (285 g/L) al filtrado agitado. El pH de la disolución resultante se ajustó a 2,5 - 3,5 con ácido acético 1 M o con hidróxido sódico 0,1 M. Después de 10 - 15 min, se detuvo la agitación y la disolución se incubó hasta el día siguiente a 3 - 5°C.

##### Centrifugación

La disolución proteica que contenía sulfato amónico se separó mediante centrifugación a 14.000 g. El sobrenadante se desechó y se recogió el precipitado.

##### Disolución proteica

El precipitado se resuspendió hasta el día siguiente a 3 - 5°C en 40 L de una disolución diluida recién preparada que contiene ácido acético 0,3 M y ácido ascórbico al 1%, pH 2,4 - 2,6 con agitación, como sigue: se preparó la disolución diluida y se enfrió previamente a 3 - 5°C. El precipitado se añadió lentamente a la disolución diluida durante aproximadamente 15 min con agitación continua. La suspensión se agitó a 3 - 5°C hasta el día siguiente.

##### Ultrafiltración (concentración y diálisis)

La suspensión se prefiltró a través de un filtro Milligard de 0,5  $\mu\text{m}$  (Millipore, Francia). El filtrado se recogió. Al final de la filtración, el filtro se purgó con aire para eliminar las proteínas residuales. La disolución filtrada se diafiltró entonces a través de una unidad de ultrafiltración que contiene 4 membranas con un PM de corte de 10 kD (Millipore; Pelicon-2; 10 KD). El conjunto del sistema de ultrafiltración se lavó previamente con agua destilada y después se equilibró con una disolución de diálisis que contiene ácido acético 0,1 M y 1 g/l de sulfato amónico. La disolución proteica se concentró en primer lugar hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 100 g/l (aproximadamente 10 litros) y se dializó frente a 4,5 - 5 volúmenes del tampón de diálisis hasta alcanzar una conductividad de  $< 3,8 \text{ mS}$  y un pH de  $3 \pm 0,2$ . La disolución se agitó a  $< 15^\circ\text{C}$ . Al final de la diafiltración, el volumen de retenido se redujo hasta aproximadamente 5 L. Entonces se lavaron las membranas de ultrafiltración con la disolución de diálisis hasta un volumen final de 10 L.

#### Filtración estéril y liofilización

La disolución diafiltrada se filtró a través de un prefiltro Milligard de 0,5  $\mu\text{m}$  y después a través de un filtro absoluto Minidisk 40 de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Francia). El filtrado se recogió en bandejas de liofilización de acero inoxidable y se liofilizó en un liofilizador (USIFROID, Francia). La composición de desbridamiento liofilizada así preparada se denomina en este documento Debrase.

#### Llenado

El llenado del polvo liofilizado de Debrase se realizó según un peso preestablecido. La Debrase se introdujo en frascos de vidrio exentos de pirógenos (30 ml (Saint-Gobain, Francia) y se cerró con tapones de plástico. Los frascos rellenos se almacenaron en un congelador a  $-20^\circ\text{C}$ . La cantidad de polvo de Debrase producido a partir de 4 Kg de bromelaína fue de 720-750 g por lote.

### **Ejemplo 2**

#### **La Debrase está desprovista de inhibidores de la bromelaína**

##### Purificación de los inhibidores de la bromelaína

Se suspendió polvo de bromelaína (2,5 g) en 10 ml de tampón de fosfato potásico 0,1 M a pH 6,1 a saturado con acetato de fenilmercurio durante 10 min. Después de centrifugar durante 10 min (3500 rpm), se aplicó un ml del sobrenadante a una cromatografía de filtración en gel en una columna de calidad preparativa Hi Load 16/60 Superdex 75 HPLC, equilibrada y eluida con el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 5 ml 30 minutos después de la aplicación de la muestra. Para cada una de las fracciones eluidas se midieron tres parámetros: (i) absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ); (ii) actividad esterolítica; y (iii) inhibición de la actividad esterolítica de la Debrase.

Se ensayó la actividad esterolítica de las fracciones de bromelaína espectrofotométricamente a pH 4,6 usando el sustrato cromógeno p-nitrofenil-L-lisinato de  $\alpha$ -benciloxicarbonilo (CLN) como sigue:

Se colocó un mililitro de tampón de acetato sódico (10 mM) que contenía KCl 0,1 M y L-cisteína 1 mM, pH 4,6 en una cubeta de plástico a  $25^\circ\text{C}$ . Se añadieron cien  $\mu\text{l}$  de la fracción eluida (a una concentración de 2,5 mg/ml). La disolución se incubó durante 2 min y después se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de una disolución de CLN (2,5 mM en acetonitrilo 10% de agua). La cubeta se mezcló y se monitorizó el incremento en la absorbancia a 317 nm durante 5 minutos. Sólo se monitorizó la hidrólisis espontánea del sustrato en presencia solo de tampón en lugar de las fracciones eluidas.

La inhibición de la actividad esterolítica de la Debrase se midió como sigue: se incubaron veinte  $\mu\text{l}$  de Debrase (0,25 mg/ml) con las diversas fracciones de la HPLC y se ensayó la actividad esterolítica de la Debrase espectrofotométricamente a pH 4,6 usando CLN según se describió anteriormente.

Según se muestra en la FIG. 2, la bromelaína de tallo eluyó en las fracciones 5 - 13 y 14 - 20. Sin embargo, los inhibidores de la bromelaína, que mostraron una inhibición de la actividad esterolítica de la Debrase, eluyeron en las fracciones 22 - 29.

La Tabla 1 muestra la actividad esterolítica de la Debrase en ausencia o en presencia de las fracciones eluidas 20 - 30. Según se observa en la Tabla 1, las fracciones 22 - 29 y inhibieron la actividad esterolítica de la Debrase. La inhibición más pronunciada se obtuvo con las fracciones 23 - 25. El peso molecular aparente de la actividad inhibidora demostró ser de aproximadamente 5 - 6 kDa, indicando así que los inhibidores de la bromelaína eluyeron en las fracciones 23 - 25.

**Tabla 1:** resultados la actividad esterolítica de la Debrase en presencia de las fracciones de bromelaína.

| Compuesto            | Actividad proteolítica | % de inhibición |
|----------------------|------------------------|-----------------|
| Debrase              | 945                    | 0               |
| + yodoacetamida 1 mM | 593                    | 37,0            |
| + Fracción 20 (5 µg) | 938                    | 0,7             |
| + Fracción 21 (5 µg) | 860                    | 9,0             |
| + Fracción 22 (5 µg) | 732                    | 22,5            |
| + Fracción 23 (5 µg) | 172                    | 81,7            |
| + Fracción 24 (5 µg) | 185                    | 80,4            |
| + Fracción 25 (5 µg) | 164                    | 82,6            |
| + Fracción 26 (5 µg) | 457                    | 51,6            |
| + Fracción 27 (5 µg) | 587                    | 37,8            |
| + Fracción 28 (5 µg) | 710                    | 24,8            |
| + Fracción 29 (5 µg) | 802                    | 15,1            |
| + Fracción 30 (5 µg) | 920                    | 2,6             |

#### Análisis mediante HPLC de la Debrase

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaños de la Debrase y de su materia prima la bromelaína con objeto de caracterizar y analizar las diferencias entre estas dos mezclas enzimáticas. La Debrase y la bromelaína se aplicaron cada una en una columna de HPLC TSK gel 3000<sub>SWX</sub> y la columna se operó a una tasa de flujo de 0,4 ml/min de tampón de fosfato 40 mM que contenía NaCl 130 mM.

La FIG. 3 muestra que, mientras que en la cromatografía de la Debrase sólo se obtuvo un pico proteico (panel superior), en la cromatografía de la bromelaína se obtuvieron tres picos (panel inferior). Se identificaron dos de los picos principales de la bromelaína: el pico nº 1 se identificó como bromelaína del tallo, mientras que el pico nº 3 se identificó como el inhibidor de la bromelaína. Según se observa en la FIG. 3, los inhibidores de la bromelaína estaban esencialmente ausentes en la Debrase, indicando por tanto que el procedimiento para preparar la Debrase permite la eliminación de los inhibidores de la bromelaína, produciendo así una composición enzimática exenta de inhibidores.

Una electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida seguida de una espectrometría de masas de las proteínas presentes de la Debrase y de una mezcla proteolítica preparada según la patente de EE.UU. nº 5.830.739, cuyo contenido se incorpora como referencia como si se estableciera completamente en este documento, mostraron que la mezcla proteolítica preparada según la patente de EE.UU. nº 5.830.739 contenía bromelaína del tallo, precursor de la bromelaína del tallo, ananaína y precursor de anan anaco así como inhibidor de la bromelaína 2 segmento 2, mientras que la Debrase contenía todas estas enzimas y precursores enzimáticos, pero estaba desprovista del inhibidor de la bromelaína. Estos resultados indican, por tanto, que el procedimiento para preparar la Debrase es muy eficaz para eliminar los inhibidores de la bromelaína.

#### **Ejemplo 3**

##### **Identificación parcial de proteínas en la Debrase**

Se sometieron la Debrase y una mezcla proteolítica preparada según la patente de EE.UU. nº 5.830.739 a un isoelectroenfoque y una SDS-PAGE como sigue:

Se suspendieron las muestras de Debrase o de la mezcla proteolítica en 200 µl de ácido trifluórico (*trifluoric acid*, TFA) al 5% en agua durante unos pocos minutos a temperatura ambiente mientras se mezclaban. Entonces las muestras se centrifugaron a 20.000 x g a 4°C durante 30 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Las concentraciones proteicas se determinaron mediante el método de Bradford. Las muestras de los sobrenadantes que contenían 100 µg de proteína se liofilizaron y se resolubilizaron en una disolución de rehidratación en gel (urea 8 M; tiourea 2 M; 5,2 µl/ml de Pharnalites (pH 3 - 10); 10 mg/ml de CHAPS (Sigma Chemicals Co.) y 2 mg/ml de DTT) y se cargaron en tiras inmovilizadas de gradiente de pH (IPG) (18 cm, gradiente lineal de pH de 3 - 10) para el isoelectroenfoque mediante la incubación de las tiras en la disolución de rehidratación que contiene las proteínas durante 24 horas. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en cuatro etapas: 1) gradiente de 0 - 500 durante 1000 Volt hora (Vh); 2) un potencial constante de 500 volts durante 2500 Vh; 3) gradiente de 500 - 3500 volt durante 10.000 Vh, y 4) un potencial constante de 3.500 volts durante 35.000 Vh. La segunda dimensión eran los geles de SDS-PAGE de acrilamida al 12,5%, bisacrilamida al 2,6%. Al final de la SDS-PAGE, se tiñeron los geles con azul de Coomassie coloidal.

La FIG. 7 muestra una SDS-PAGE de Debrase teñida con azul de Coomassie.

La FIG. 8 muestra una SDS-PAGE de Debrase teñida con azul de Coomassie de la mezcla proteolítica preparada según la patente de EE.UU. nº 5.830.739. Según se describió anteriormente en este documento, la Debrase y la mezcla proteolítica se sometieron en primer lugar a un isoelectroenfoque y después a la SDS-PAGE.

### Identificación proteica

Se cortaron las manchas de cada uno de los geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y se lavaron durante 30 minutos en 200  $\mu$ l de  $\text{NH}_4\text{NCO}_3$  200 mM -  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 50% a 37°C. Entonces las manchas lavadas se secaron, se rehidrataron con la disolución de digestión (0,02  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tripsina (Promega);  $\text{NH}_4\text{NCO}_3$  40 mM (pH 8.1);  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 10%) y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Los péptidos se extrajeron mediante la aplicación de ultrasonidos en  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 10% y los péptidos extraídos se cargaron en una microcolumna POROS 50 R2 (PerSeptive Biosystems) para su desalinización. Los péptidos eluyeron directamente en una aguja de Q-STAR (Applied Biosystems) y se midieron y analizaron usando el programa informático Analyst QS (Applied Biosystems). Las secuencias derivadas del análisis mediante EM/EM se usaron para una búsqueda BLAST corta en la base de datos del NCBI.

La Tabla 5 enumera la identidad de las manchas de proteínas designadas como 1 - 4 y 5 - 9 en las FIGs. 7 y 8, respectivamente.

Tabla 5. Enzimas proteolíticas e inhibidores de la bromelaína identificados en la Debrase o en la mezcla proteolítica.

| Debrase                      |                                                       | La mezcla proteolítica       |                                            |
|------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|
| Número de mancha y secuencia | Proteína                                              | Número de mancha y secuencia | Proteína                                   |
| #1<br>AFEFIISNKG             | Bromelaína de tallo<br>EC 3.4.22.32                   | #5<br>QDEYKCYC               | Inhibidor de la bromelaína - piña XBPI     |
| #2<br>IDWRDSGAVTS            | Ananaína<br>EC 3.4.22.31                              | #6<br>CPGFCKTCKAE            | Inhibidor de la bromelaína VI<br>S66609    |
| #3<br>YPYKAAKGCTKTDG         | Bromelaína,<br>tallo P14518                           | #7<br>CVCADTYSDC             | Inhibidor de la bromelaína VII<br>P01068_2 |
| #4<br>SRDEPSDPMK             | Precursor de la<br>proteínasa de cisteína<br>CAA08861 | #8<br>ATVESIYK<br>GEAGYIR    | precursor FBSB<br>BAA22544                 |
|                              |                                                       | #9<br>GSSWGEGGYVR            | Bromelaína del fruto EC<br>3.4.22.33       |

Según se observa en la Tabla 5, se identificaron tres tipos de inhibidores de la bromelaína (inhibidor de la bromelaína - piña, inhibidor de la bromelaína VI y VII) en la mezcla proteolítica, pero no en la Debrase. Estos resultados indican que la Debrase está esencialmente desprovista de inhibidores.

### Ejemplo 4

#### Actividad *in vivo* de la Debrase

Se usó el modelo *in vivo* de herida por quemadura en cerdo para la valoración de la eficacia de desbridamiento de la Debrase. Debido al gran parecido de la piel porcina joven a la del ser humano, se sabe que este modelo *in vivo* de herida por quemadura es un modelo aceptado de quemaduras térmicas cutáneas en seres humanos.

El dispositivo para infligir quemaduras, que consistía en un elemento calentador radiante eléctrico modificado encerrado en un alojamiento metálico, se ajustó a 400°C durante un periodo de 15 segundos para crear quemaduras profundas en dermatomas simétricos de 3 cm a lo largo de su línea central (espinal). El tamaño de la quemadura se controló colocando un molde de amianto con un agujero cuadrado de 4,5 X 4,5 cm, mantenido sobre la zona proyectada de quemadura sobre la piel de cerdo, y se fijó el quemador al agujero a una distancia estándar de la piel. La piel adyacente se protegió mediante el escudo de amianto. Se infligió un número igual de 5 -14 pares de quemaduras profundas (dependiendo de las necesidades) en cada lado. Una vez infligidas todas las quemaduras, la capa superior de queratina de la escara se eliminó limpiándola con esponjas Skleaner™ normales empapadas en disolución salina hasta que se reveló la dermis expuesta limpia. Entonces se hidrataron todas las áreas de las quemaduras aplicando esponjas de gasa empapadas en disolución salina a cada quemadura durante un periodo de aproximadamente 1 hora, aplicando constantemente de nuevo la disolución salina para asegurar que las áreas quemadas no se secaran.

Después de aproximadamente 1 hora de hidratación, se colocó una barrera adhesiva alrededor de cada área quemada en la piel sana circundante. Entonces se mezclaron cinco ml de un vehículo de gel que contenía Carbomer 980 y fosfato sódico dibásico en agua, pH 7,4, con 0,5 g de polvo de Debrase, y se aplicaron sobre las heridas que se extendían hacia el borde interior de la barrera adhesiva, cubriendo un área de 5 x 5 cm. En las zonas de control sólo se usaron 5 ml del gel. Toda la herida, cubierta con la capa de gel y rodeada por la barrera adhesiva, se cubrió entonces con una película oclusiva que se adhirió a la barrera adhesiva. La película oclusiva se adhirió íntimamente al gel, de forma que no quedó atrapado aire bajo la película. Se insertó una pequeña sonda de temperatura a través de la barrera adhesiva para monitorizar la temperatura del gel en la cámara, que se mantuvo a entre 37°C y 40°C usando una lámpara de calentamiento. Toda la parte trasera se cubrió con un apósito de algodón suave (gasa) (Kerlix o similar) con objeto de estabilizar todos los apósitos oclusivos en las diversas zonas. El apósito se dejó durante cuatro horas. Después se retiró el apósito, se limpió el gel con la escara disuelta con un depresor lingual de madera y el lecho de la herida se exfolió con el Skleaner hasta que se eliminó todo el tejido suelto o disuelto. Después de limpiar las heridas, las heridas se empaparon con una gasa empapada en disolución salina durante otra hora y se evaluaron visualmente.

**Tabla 2:** actividad *in vivo* de bromelaína y de Debrase

| Sustrato de desbridamiento | Cantidad (g) | Portador usado  | Cantidad (g) | Puntuación final |
|----------------------------|--------------|-----------------|--------------|------------------|
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,5          | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 2,5              |
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,5          | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 2                |
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,25         | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 2                |
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,25         | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 2                |
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,125        | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 1,5 - 2          |
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,125        | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 2                |
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,0625       | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 1 - 1,5          |
| Bromelaína (lote 06 03)    | 0,0625       | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 1,5              |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,5          | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 5                |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,5          | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 4,5              |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,25         | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 4                |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,25         | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 4                |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,125        | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 3,5              |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,125        | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 3,5 - 4          |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,0625       | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 3                |
| Debrase MD2/D01-04         | 0,0625       | Gel MG20/C05-08 | 0,5          | 3,5              |

Según se muestra en la Tabla 2, se encontró que la Debrase era más eficaz en el desbridamiento de una herida por quemadura que la bromelaína. Por ejemplo, 0,5 g de Debrase produjeron una puntuación de valoración visual (Visual Assessment Scoring, VAS) media de 4,75 (la puntuación más alta es 5) en comparación con una VAS media de 2,25 para la misma cantidad de bromelaína. Además, 0,25 g de Debrase desbridaron una herida por quemadura mucho mejor que la bromelaína (VAS 4 en comparación con VAS 2, respectivamente).

### Ejemplo 5

#### Actividad *ex vivo* de la Debrase

Se realizó un ensayo basado en la digestión de trozos de tejido de piel de cerdo por la Debrase. Se quemaron trozos de piel de oreja de cerdo (de aproximadamente 1 cm de diámetro) y se sometieron a una proteólisis con Debrase. Se monitorizó el tiempo hasta el desgarro del tejido con la Debrase. El ensayo se realizó como sigue:

Se preparó la piel de oreja de cerdo separando la piel del cartílago y eliminando el exceso de grasa. Se hirvieron trozos de la piel de oreja de cerdo durante 20 s y se colocaron en el fondo de un soporte de piel con 5 ml de PD-Tip por encima, y el soporte superior de la piel se ajustó a la parte superior. Se mezclaron la Debrase o la bromelaína con una fase acuosa (por ejemplo, Gel, Silverol o tampón) y se aplicaron en el fondo de la celda usando bien una jeringa equipada con un tubo de plástico o bien una pipeta. Se midió el tiempo hasta el desgarro de los trozos de piel de oreja.

Resultados**Tabla 3:** actividad de desbridamiento *ex vivo* de la Debrase.

|       | MD5/C07 - 45 |     |     |       | MD2/D01 - 45 |     |     |       |       |
|-------|--------------|-----|-----|-------|--------------|-----|-----|-------|-------|
| mg/ml | 1            | 2   | 3   | Media | 1            | 2   | 3   | Media | D. T. |
| 0,375 | 181          | 272 | 272 | 241,7 | 265          | 270 | 236 | 257,0 | 18,36 |
| 0,75  | 263          | 200 | 237 | 233,3 | 216          | 261 | 144 | 207,0 | 59,02 |
| 1,56  | 193          | 101 | 163 | 152,3 | 132          | 131 | 168 | 143,7 | 21,08 |
| 3,125 | 127          | 128 | 131 | 128,7 | 118          | 103 | 87  | 102,7 | 15,50 |
| 6,25  | 74           | 61  | 30  | 55,0  | 56           | 78  | 68  | 67,3  | 11,02 |
| 12,5  | 62           | 57  | 60  | 59,7  | 48           | 65  | 48  | 53,7  | 9,81  |
| 25    | 43           | 16  | 33  | 30,7  | 44           | 42  | 49  | 45,0  | 3,61  |
| 50    | 88           | 21  | 55  | 54    | 33           | 52  | 22  | 35,67 | 15,18 |

**Tabla 4:** actividad de desbridamiento *ex vivo* de la bromelaína.

|       | BSP 05 03 |     |     |       | BSP 06 03 |     |     |       |
|-------|-----------|-----|-----|-------|-----------|-----|-----|-------|
| mg/ml | 1         | 2   | 3   | Media | 1         | 2   | 3   | Media |
| 0,375 | 232       | 232 | 231 | 231,7 | 231       | 230 | 229 | 230,0 |
| 0,75  | 144       | 240 | 136 | 173,3 | 240       | 240 | 171 | 217,0 |
| 1,56  | 149       | 180 | 141 | 156,7 | 240       |     | 160 | 133,3 |
| 3,125 | 114       | 161 | 229 | 168,0 | 110       | 97  | 160 | 122,3 |
| 6,25  | 142       | 121 | 105 | 122,7 | 80        | 110 | 106 | 98,7  |
| 12,5  | 64        | 139 | 195 | 132,7 | 102       | 134 | 83  | 106,3 |
| 25    | 36        | 104 | 53  | 64,3  | 34        | 58  | 63  | 51,7  |
| 50    | 37        | 35  | 72  | 48,00 | 56        | 55  | 32  | 47,67 |

Las Tablas 3 y 4 muestran las diferencias de la actividad *ex vivo* entre la Debrase y la bromelaína. La Tabla 3 y la Fig. 4 muestran que la Debrase, a una concentración de 12,5 mg/ml en tampón, desbridaba la piel de oreja de cerdo en  $56,7 \pm 9,81$  min. Unas concentraciones mayores de Debrase no dieron como resultado un desbridamiento más rápido. Unas concentraciones menores de Debrase provocaron un desbridamiento en periodos de tiempo más largos. El límite de detección para la Debrase era de 3,125 mg/ml ( $115,35 \pm 15,5$  min).

Los resultados también muestran que la Debrase es más eficaz en el desbridamiento tisular a bajas concentraciones que su materia prima, la bromelaína (véase FIG. 4 con respecto a la FIG. 5). Según se muestra en la FIG. 6, unas concentraciones bajas (0 - 5 mg/ml) y altas (20 - 50 mg/ml) de Debrase y de bromelaína muestran unos tiempos hasta el desgarrar similares. Sin embargo, a unas concentraciones de 5 - 20 mg/ml se mostró que la Debrase era dos veces más rápida que la bromelaína para desgarrar la piel de oreja de cerdo.

Los expertos en la materia apreciarán que la presente invención no está limitada por lo que se ha mostrado y descrito particularmente en este documento anteriormente. Más bien, el ámbito de la invención está definido por las reivindicaciones que siguen.

# REIVINDICACIONES

1. Una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína, comprendiendo la composición de desbridamiento enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando dicha composición sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína.
- 5 2. La composición de desbridamiento según la reivindicación 1, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 10% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
3. La composición de desbridamiento según la reivindicación 2, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 5% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
- 10 4. La composición de desbridamiento según la reivindicación 3, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 2% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
5. La composición de desbridamiento según la reivindicación 4, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 1% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
6. La composición de desbridamiento según la reivindicación 1 consistente esencialmente en un único pico proteico tras una elución desde una columna de HPLC de exclusión por tamaños TSK-Gel 3000<sub>SWXL</sub>, constituyendo el único pico proteico proteínas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa.
- 15 7. La composición de desbridamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
8. Un procedimiento para obtener una composición de desbridamiento a partir de bromelaína, comprendiendo la composición de desbridamiento enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando dicha composición sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:
  - (a) suspender la bromelaína en una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante, teniendo la disolución ácida un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;
  - (b) ajustar la suspensión de (a) a un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 25 43,5;
  - (c) añadir un coadyuvante de filtrado a la suspensión de (b);
  - (d) filtrar la suspensión de (c) para eliminar los componentes insolubles;
  - (e) añadir a la disolución filtrada de (d) una sal de sulfato amónico para conseguir una saturación de sulfato amónico en el intervalo desde aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 50%;
  - (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 43,5;
  - (g) incubar la suspensión de (f) a 3°C - 10°C;
  - (h) centrifugar la suspensión de (g) para conseguir un precipitado de sulfato amónico;
  - (i) disolver el precipitado de sulfato amónico en una disolución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante con un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 4;
  - (j) filtrar la disolución de (i) de forma que se retengan las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en 35 un exceso de aproximadamente 10 kDa; y
  - (k) liofilizar la disolución retenida de (j).
9. El procedimiento para obtener una composición de desbridamiento a partir de bromelaína según la reivindicación 8 que comprende las siguientes etapas:
  - (a) suspender la bromelaína en ácido acético 0,3 M que comprende un 1% de ácido ascórbico y n-octanol con un pH desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,6;
  - (b) ajustar la suspensión de (a) a un pH en el intervalo desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5;
  - (c) añadir un coadyuvante de filtrado que comprende sílice a la suspensión de (b);
  - (d) filtrar la suspensión de (c) a través de un filtro prensa para eliminar los componentes insolubles;
  - (e) añadir a la disolución filtrada de (d) una sal de sulfato amónico (285 g/L) para conseguir una saturación del 40% de sulfato amónico;
  - (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5;
  - (g) incubar la suspensión de (f) durante aproximadamente 12 - 24 horas a 4°C;
  - (h) centrifugar la suspensión de (g) para conseguir un precipitado de sulfato amónico;
  - (i) disolver el precipitado de sulfato amónico en ácido acético 0,3 M que comprende un 1% de ácido ascórbico con un pH desde aproximadamente 2,4 hasta aproximadamente 2,6;
  - (j) filtrar la disolución de (i) a través de un ultrafiltro de 10 kDa, de forma que se retengan las enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares en un exceso de aproximadamente 10 kDa;
  - (k) filtrar la disolución retenida de (j) para conseguir una disolución estéril; y
  - (l) liofilizar la disolución filtrada de (k).
- 40 45 50 55

10. Uso de una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelaína para la elaboración de un medicamento para tratar una herida mediante el desbridamiento de tejidos no viables, comprendiendo la composición de desbridamiento enzimas proteolíticas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa, estando dicha composición sustancialmente desprovista de inhibidores de la bromelaína.
- 5 11. El uso de la composición de desbridamiento según la reivindicación 10, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 10% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
12. El uso de la composición de desbridamiento según la reivindicación 11, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 5% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
- 10 13. El uso de la composición de desbridamiento según la reivindicación 12, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 2% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
14. El uso de la composición de desbridamiento según la reivindicación 13, en la que los inhibidores de la bromelaína son menos del 1% p/p del contenido proteico de dicha composición de desbridamiento.
- 15 15. El uso de la composición de desbridamiento según la reivindicación 10, en la que la composición de desbridamiento consiste esencialmente en un único pico proteico tras una elución desde una columna de HPLC de exclusión por tamaños TSK-Gel 3000<sub>SWXL</sub>, constituyendo el único pico proteico proteínas con unos pesos moleculares de aproximadamente 23 kDa.
16. El uso de la composición de desbridamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en la que la composición de desbridamiento comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 17. El uso de la composición de desbridamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en la que la herida se elige del grupo formado por quemaduras heridas por quemaduras con un espesor total y parcial, quemaduras solares, quemaduras por congelación, lesiones ulcerosas, úlceras de presión (decúbito), úlceras varicosas, úlceras por estasis, úlceras tróficas, heridas asociadas a procedimientos quirúrgicos, amputación, incisión, circuncisión y episiotomía, heridas traumáticas y piógenas, vaginitis, cervicitis, heridas por quistes pilonidales, tejido cicatrizal de cataratas y zonas de injertos cutáneos.

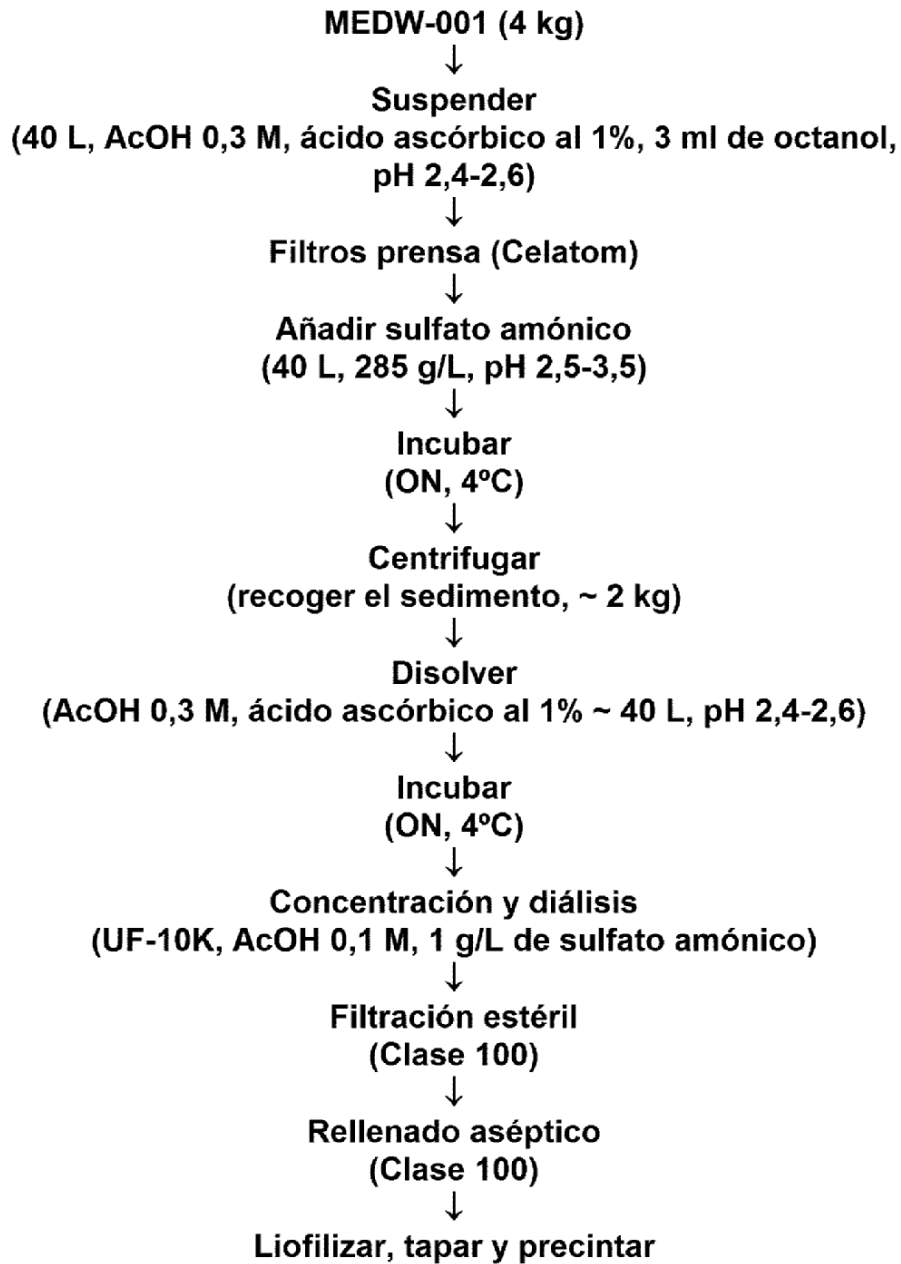


FIG. 1

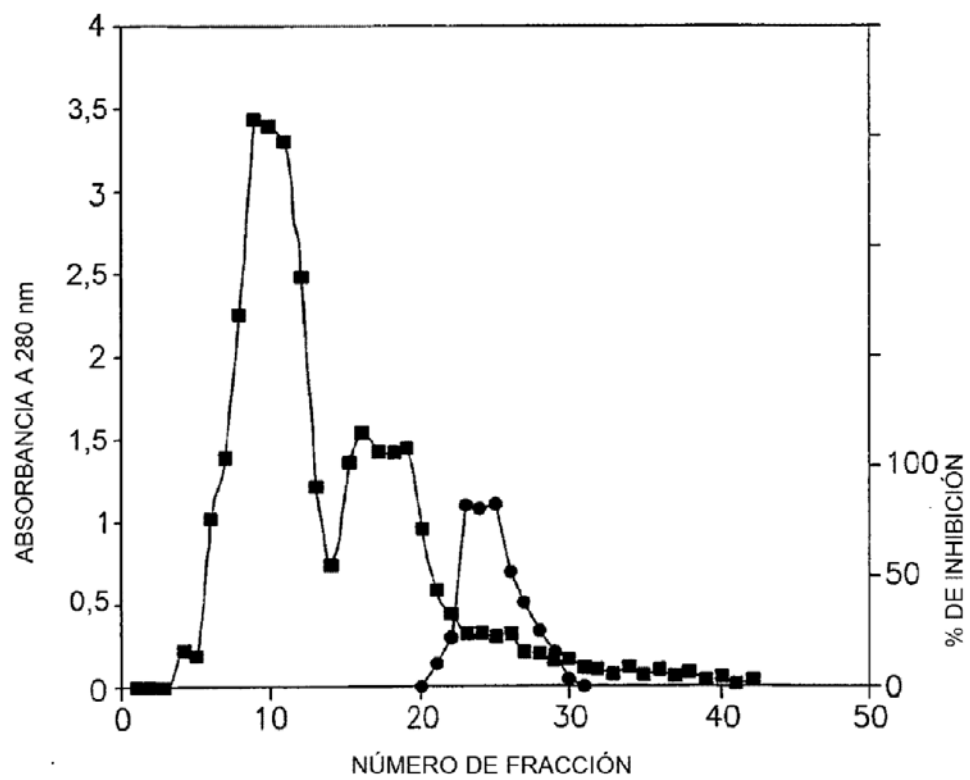


FIG.2

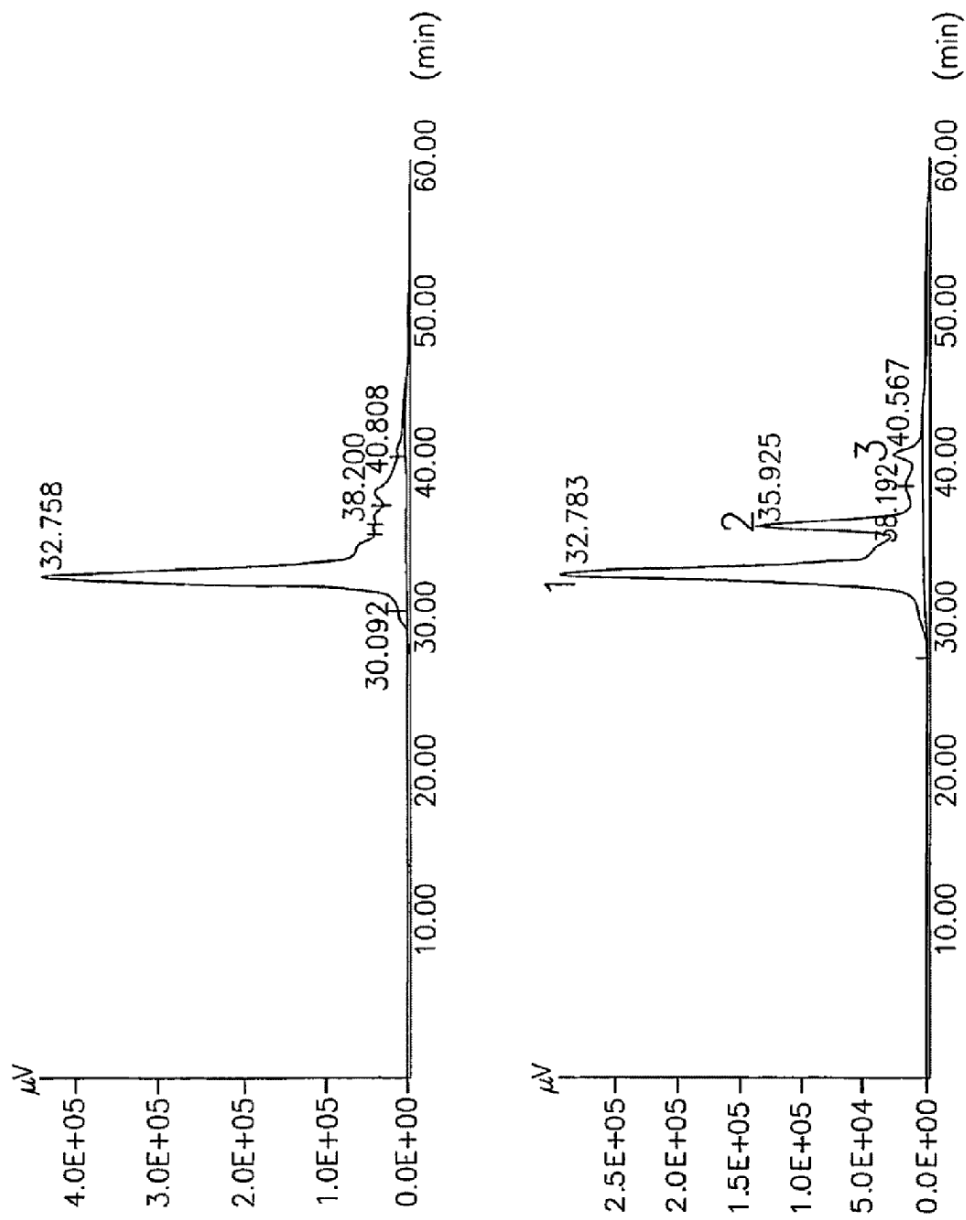


FIG.3

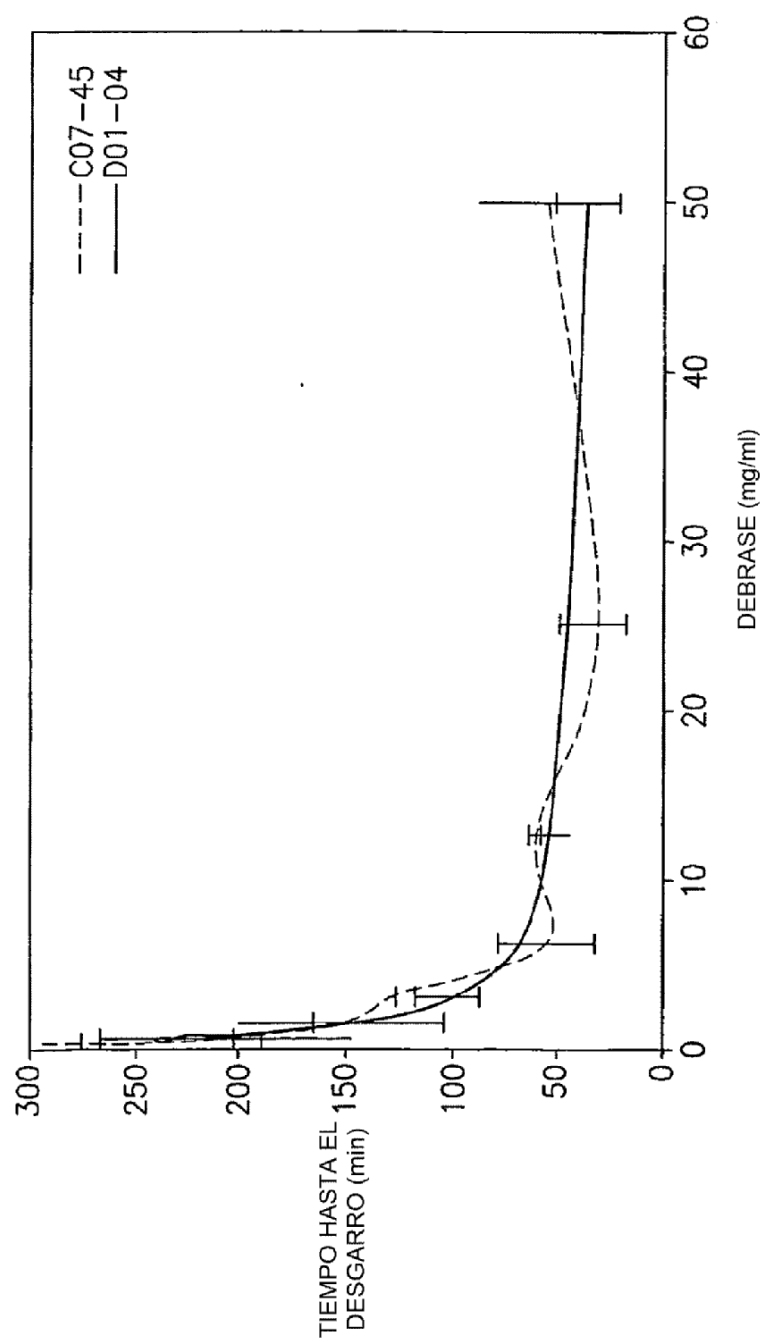


FIG.4

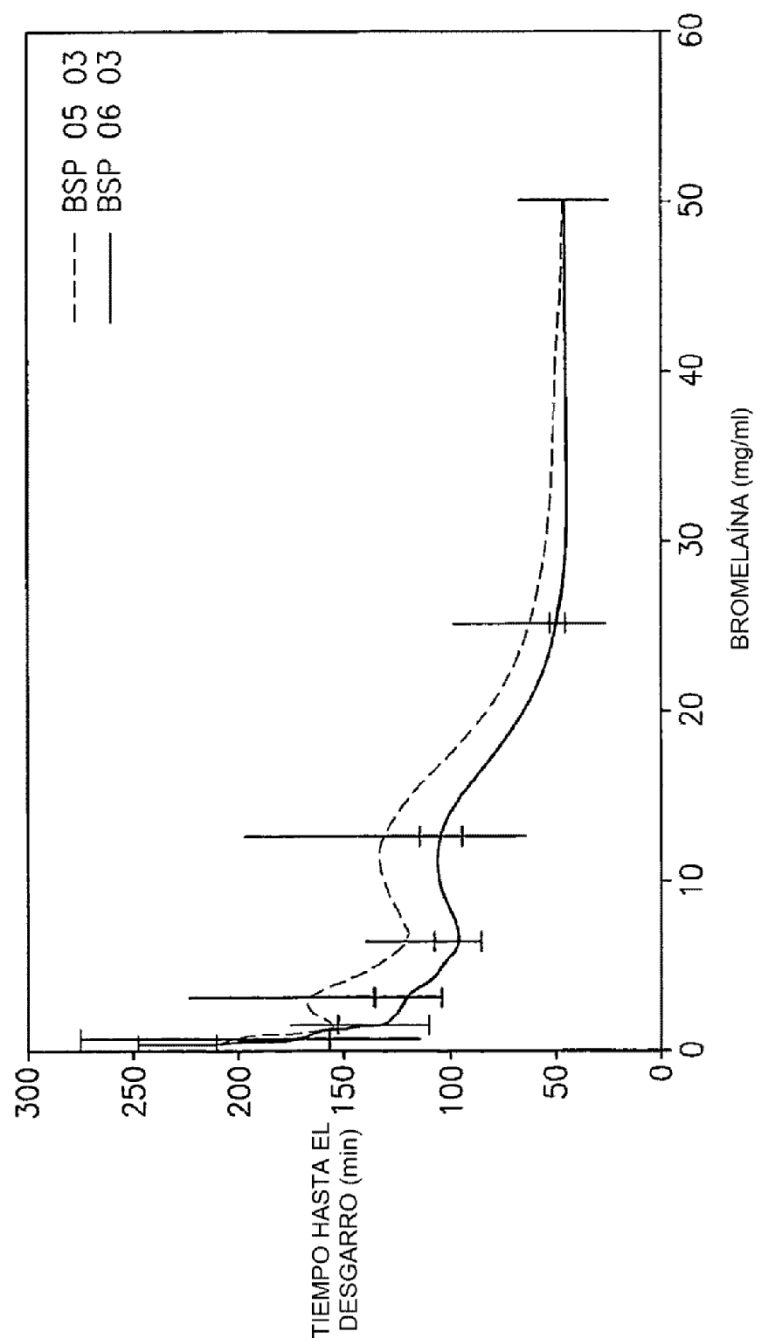


FIG.5

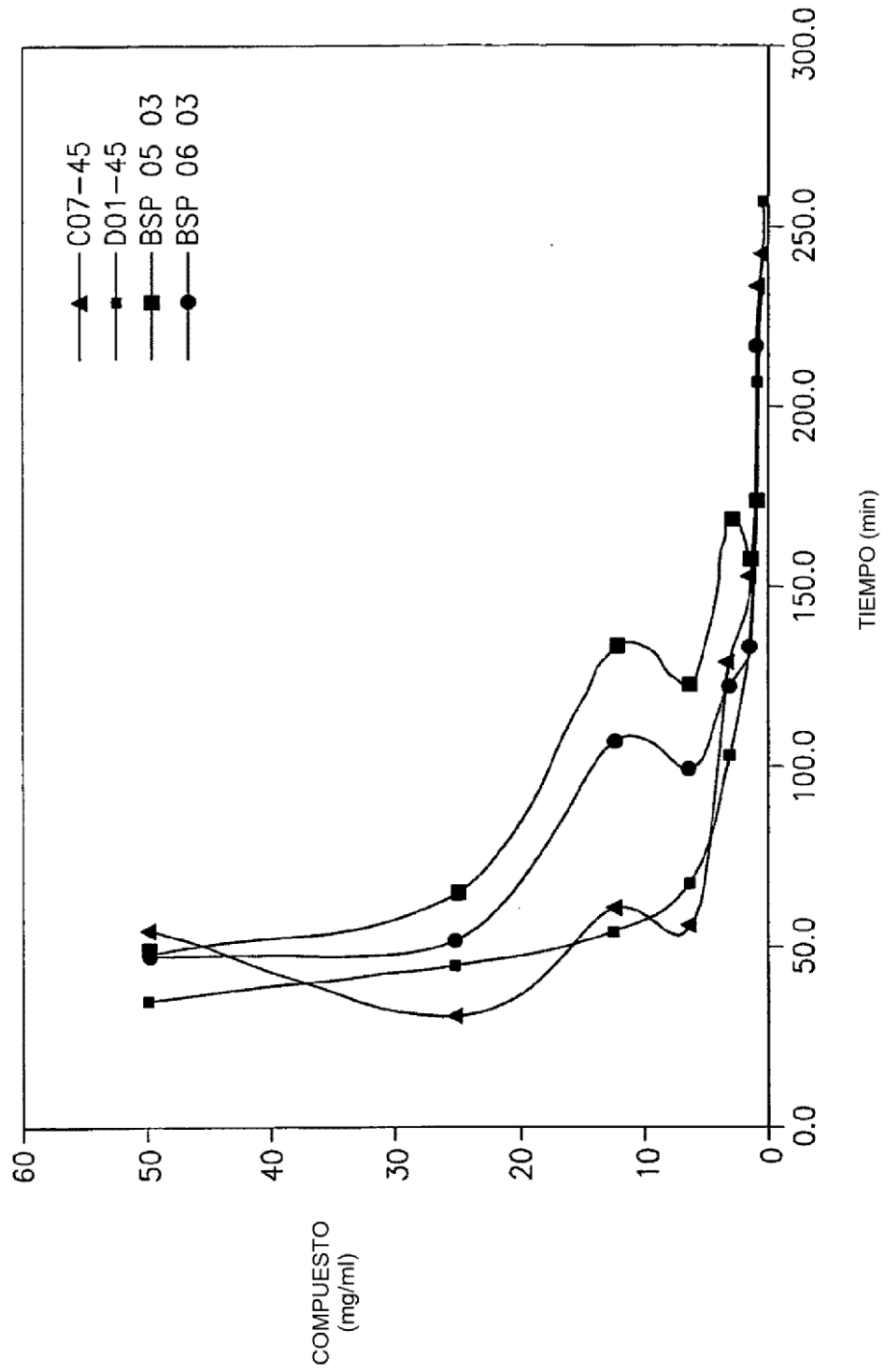


FIG.6

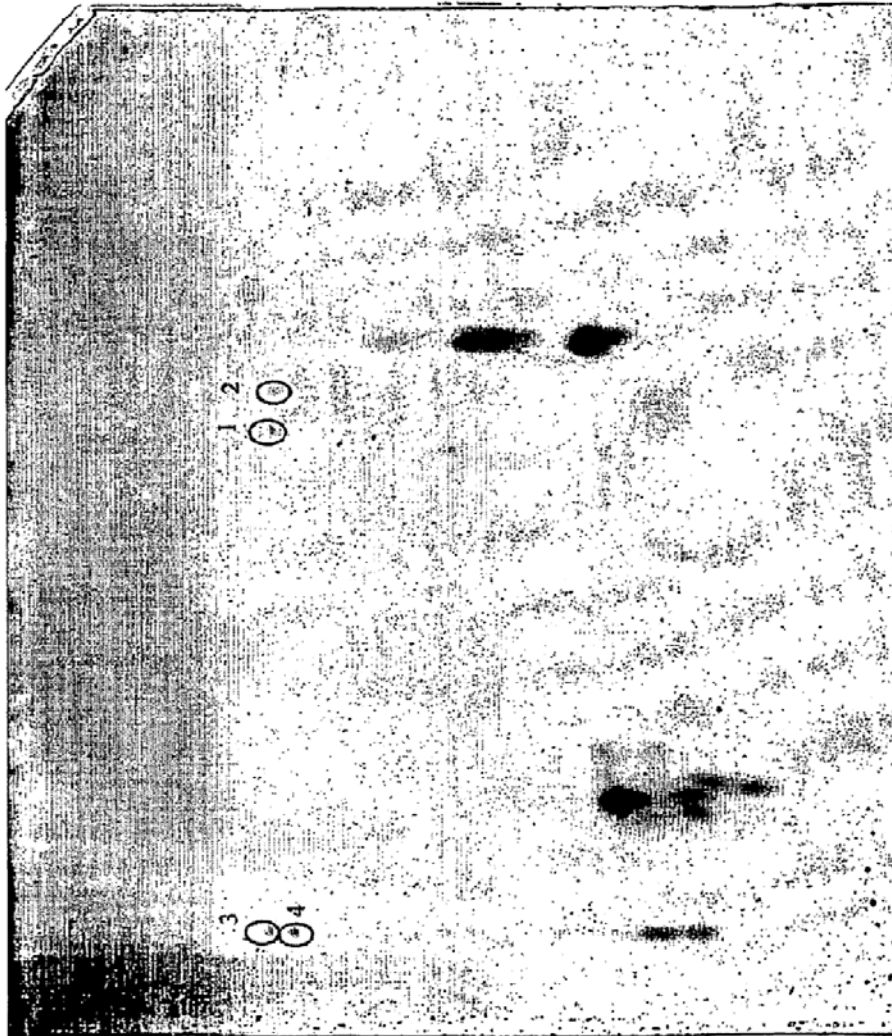


FIG. 7

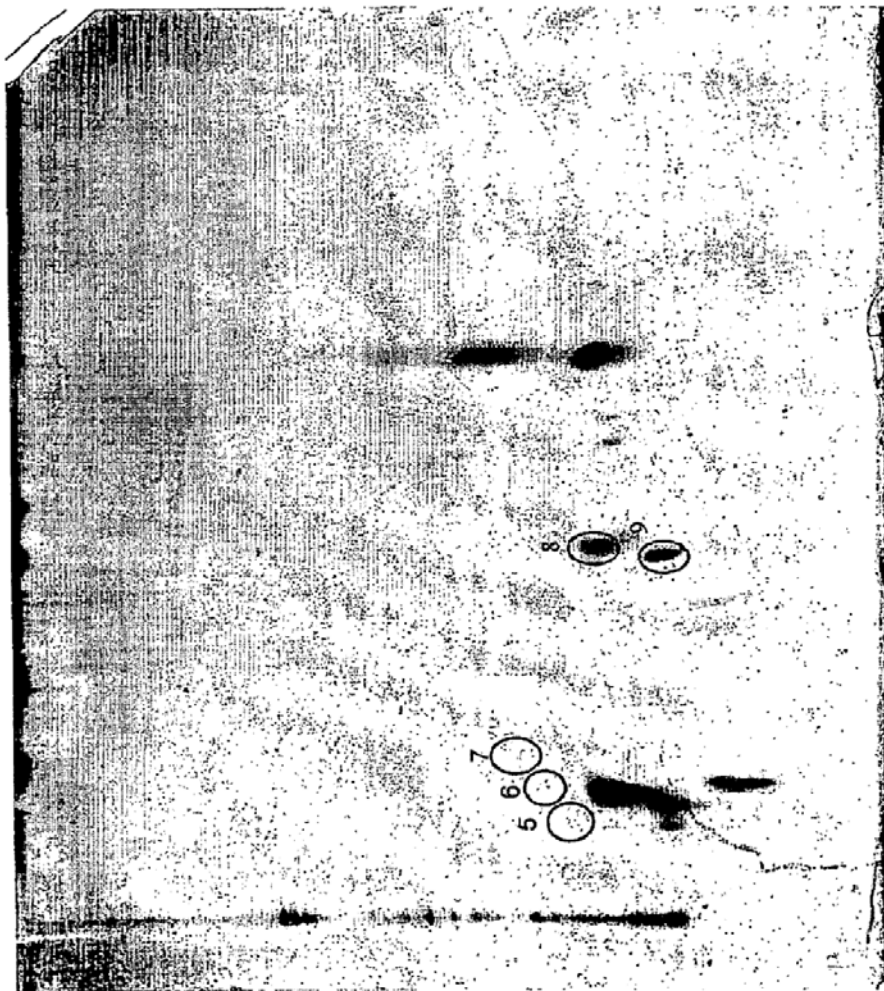


FIG. 8