

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 866**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/54** (2006.01)

**C12N 9/96** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009 E 09010840 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2161333**

54 Título: **Estabilización de la termolisina en solución acuosa**

30 Prioridad:

**27.08.2008 EP 08015100**

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

**05.03.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**HOELKE, WERNER;  
LIEHRE, ANTJE;  
THALHOFER, JOHANN-PETER y  
WEBER, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 445 866 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

Estabilización de la termolisina en solución acuosa

5 La presente invención pertenece al campo de la bioquímica. La presente invención trata sobre la enzima proteolítica termolisina, que tiende a ser inestable en solución acuosa. La invención proporciona métodos y compuestos para potenciar la estabilidad de la termolisina disuelta en solución acuosa. La termolisina, la termolisina en bruto o un liofilizado que contiene termolisina y una o más sales, se ponen en contacto con un tampón acuoso con una concentración salina baja y se forma una primera solución. Subsiguientemente, se añade una sal adicional en forma  
10 sólida y se disocia para formar así una segunda solución que incluye termolisina en una forma estabilizada.

Antecedentes de la invención

15 La termolisina [EC 3.4.24.27; número de registro CAS 9073-78-3] es una metaloproteinasa neutra termoestable (también referida aquí como "proteasa neutra") producida en el caldo de cultivo de *Bacillus termoproteolyticus* (Endo, S., J., *Ferment. Technol.* 40 (1962) 346-353; Matsubara, H., Feder, J., in: 3ª edición, Boyer, P., D., (editores), *The Enzymes*, vol. 3, Academic Press, Nueva York, 1971, páginas 721-795). Ésta requiere un ión de zinc para la actividad enzimática y cuatro iones de calcio para su estabilidad estructural (Latt, S., A., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37 (1969) 333-339; Feder, J., et al. *Biochemistry* 10 (1971) 4552-4556; Tajima, M., et al. *Eur. J. Biochem.* 64 (1976) 243-247) y cataliza especialmente la hidrólisis de puentes peptídicos que contienen residuos de  
20 aminoácido hidrófobos (Moriyama, K., Tsuzuki, H., *Eur. J. Biochem.* 15 (1970) 374-380; Inouye, K., et al. *Biochem. J.* 315 (1996) 133-138). La termolisina se utiliza ampliamente para la formación de puentes peptídicos mediante la reacción inversa a la hidrólisis (Oyama, K., et al., *J. Chem. Soc. Perkin II* (1981) 356-360; Nakanishi, K., et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 613 (1990) 652-655; Trusek-Holownia, A., *J. Biotechnol.* 102 (2003) 153-163). El gen npr que codifica por la termolisina se aisló en *B. termoproteolyticus* (O'Donohue, M., J., et al., *Biochem. J.* 300 (1994) 599-603). El análisis de secuencias revela que la termolisina se sintetiza como una preproteína que incluye un péptido señal (28 residuos), una prosequencia (204 residuos), y una secuencia madura (316 residuos) (O'Donohue, M., J., et al., visto anteriormente). La prosequencia actúa como una chaperona intramolecular que conduce a la escisión autocatalítica del puente peptídico que une la prosequencia y la secuencia madura (O'Donohue, M., J., et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 26477-26481; Marie-Claire, C., et al., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5697-5701; Marie-Claire, C., et al., *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 1911-1915).

35 Se puede calcular la extinción teórica a 280 nm de la termolisina intacta en agua mediante la utilización de la "herramienta ProtParam" que se encuentra disponible públicamente a través de internet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). ProtParam es una herramienta que permite el cómputo de varios parámetros físicos y químicos para una proteína determinada almacenada en Swiss-Prot o TrEMBL o para una secuencia introducida por un usuario. Los parámetros computados incluyen el peso molecular, el pI teórico, la composición de aminoácidos, la composición atómica, el coeficiente de extinción, la semivida estimada, el índice de inestabilidad, el índice alifático y el promedio general de hidropaticidad. De acuerdo con esto, se puede calcular el  
40 valor de absorbancia teórico en agua de A (1 mg/ml) de 1,696 a 280 nm.

45 El fabricante de la termolisina (Daiwa Kasei K.K., Japón), haciendo referencia a Ohta, Y et al. (*J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5919-5925), indica una absorbancia de A (1 mg/ml), de 1,765 a 280 nm en 50 mM del tampón TrisHCl, pH de 7.

Inouye, K., et al. (*J. Biochem.* 123 (1998) 847-852) describe un valor de absorbancia A (1 mg/ml) de 1,83, determinado a 277 nm y 25°C para el lote de termolisina T8BA51 (Daiwa Kasei K.K., Osaka, Japón) en 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 40 mM de TrisHCl, pH de 7,5.

50 La termolisina puede obtenerse como un liofilizado a partir de proveedores comerciales. Daiwa Kasei K.K. (Japón) distribuye una termolisina con un peso molecular de 34.600 Da (Daltons), un pH óptimo un pH 8,0 y una temperatura óptima de entre 65°C y 70°C. De acuerdo con el fabricante, la enzima es estable en un intervalo de pH de entre 5,0 y 8,5. Se indica una solubilidad de 0,02% en la solución de tampón diluido. Se puede obtener termolisina cristalizada dos veces en forma de polvo amorfo liofilizado, en el que la enzima proteica representa el 60% [peso/peso] o superior en relación a la materia seca. La materia seca además contiene acetato cálcico anhidro (aproximadamente el 20% [peso/peso]) y acetato sódico anhidro (aproximadamente el 10% [peso/peso]). Para la cristalización posterior, el fabricante describe un método que incluye los pasos de suspender el liofilizado a una concentración de entre el 1% [peso/volumen] y el 5% [peso/volumen] en una solución acuosa de 0,01 M de acetato cálcico. El material suspendido se disuelve mediante la adición gota a gota de 0,2 N de hidróxido de sodio bajo agitación para que el pH  
55 de la solución acuosa presente un valor comprendido entre 11,0 y 11,4. Tras la sustracción de cualquier residuo no disuelto, el pH de la solución se ajusta a un pH de 6,0 con 0,2 N de ácido acético. Habitualmente, la cristalización se completa en aproximadamente 2 días. El proceso completo se lleva a cabo a una temperatura de entre 0° y 2°C.

65 También están disponibles unos preparados de termolisina de Daiwa Kasei K.K. (Japón) bajo el nombre comercial THERMOASE.

La patente EP 0 640 687 describe una solución acuosa de 7 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1,75 M de NaCl en la que se disolvió THERMOASE para dar como resultado una concentración de aproximadamente 36 mg/ml. La pureza de la termolisina en el polvo seco THERMOASE fue de aproximadamente el 20%. Si se tiene en cuenta la pureza, la concentración de termolisina en la solución acuosa fue de aproximadamente 7 mg/ml.

Inouye, K., et al. (J. Biochem. 123 (1998) 847-852) describieron que la termolisina es una proteína escasamente soluble. Se sugirió que la mayor parte de la superficie de la proteína es hidrófoba y esto se respalda por el hecho que la termolisina puede purificarse eficientemente mediante la cromatografía de interacción hidrófoba (Inouye, K., et al., Protein Expression and Purification 46 (2006) 248-255). Como consecuencia de su baja solubilidad, la enzima tiene una fuerte tendencia a precipitar unas horas después de que se preparen las soluciones.

Inouye, K. et al. (J Biochem., visto anteriormente) también demostraron que la solubilidad de la termolisina en un disolvente acuoso puede aumentar si se disuelven ciertas sales neutras en el disolvente cuando éste se pone en contacto con un preparado liofilizado de termolisina. Se observó que el efecto era dependiente de (1) la temperatura, (2) la sal neutra particular presente en el disolvente, y (3) la concentración de la sal neutra respectiva. En el documento de Inouye, K. et al. (J Biochem. , visto anteriormente), la figura 2 describe los resultados de una serie de experimentos en los que se mezcló una cantidad excesiva del polvo liofilizado de termolisina (preparado de termolisina liofilizado y cristalizado tres veces (Daiwa Kasei K.K., Osaka, Japón; Lote T8BA51); utilizado sin purificación adicional) con un "tampón estándar" (10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 40 mM de TrisHCl, pH de 7,5), que además contenía una sal a una concentración predeterminada (en el rango que va de 0,5 M a 5 M). La concentración de la proteína disuelta se determinó mediante espectrofotometría utilizando un valor de absorbancia, A (1 mg/ml), a 277 nm de 1,83 y una masa molecular de 34,6 kDa.

Las tablas 1-4 reproducen los valores numéricos aproximados que indican las concentraciones de la proteína disuelta tal y como se describen gráficamente en la figura 2 de Inouye, K. et al. (J Biochem., visto anteriormente), a dos temperaturas diferentes (0°C y 37°C). Las concentraciones de proteína tabuladas se expresan en mg/ml. En cada tabla, se indican las sales disueltas en el tampón estándar, así como sus concentraciones respectivas.

Tabla 1

Concentraciones de proteína soluble (en [mg/ml]) a 0°C en tampón estándar que contiene sal					
Sal	Concentración de la sal en el tampón estándar				
	0,5 M	1,0 M	1,5 M	2,0 M	2,5 M
NaCl	□6,4	□8,9	□10,3	□12,2	□11,6
KCl	□4,5	□6,3	□7,5	□6,5	□5,3
LiCl	□1,9	□3,3	□4,5	□5,3	□6,6
NaBr	□4,4	□6,6	□15,6	□25,3	□38,4
NaJ	□5,5	□7,8	□20,3	□29,2	□32,5

Tabla 2

Concentraciones de proteína soluble (en [mg/ml]) a 0°C en tampón estándar que contiene sal					
Sal	Concentración de la sal en el tampón estándar				
	3,0 M	3,5 M	4,0 M	4,5 M	5,0 M
NaCl	□9,5	□8,1	□6,9	□5,3	□3,8
KCl	□5,2	□4,4	□4,1	□3,4	□2,5
LiCl	□8,0	□11,1	□14,7	□21,6	□26,3
NaBr	□40	□36,6	□30	□27,8	□25,3
NaJ	□34,4	□37,5	□38,6	□42,3	§

§ fuera del rango de detección

Tabla 3

Concentraciones de proteína soluble (en [mg/ml]) a 37°C en tampón estándar que contiene sal					
Sal	Concentración de la sal en el tampón estándar				
	0,5 M	1,0 M	1,5 M	2,0 M	2,5 M
NaCl	□2,7	□3,8	□5,5	□7,5	□8,8
KCl	□1,6	□3,1	□3,2	□4,2	□3,4
LiCl	□0,9	□2,2	□2,5	□3,1	□4,5
NaBr	□3,4	□5,0	□9,7	□13,3	□18
NaJ	□3,4	□6,2	□18	□24,5	□34,4

Tabla 4

Concentraciones de proteína soluble (en [mg/ml]) a 37°C en tampón estándar que contiene sal					
Sal	Concentración de la sal en el tampón estándar				
	3,0 M	3,5 M	4,0 M	4,5 M	5,0 M
NaCl	□7,4	□5,5	□3,1	□2,3	□1,0

## ES 2 445 866 T3

Sal	KCl	□3,1	□2,8	□2,2	□1,9	□0,6
	LiCl	□7,0	□8,8	□11,3	□18	□22,3
	NaBr	□22,2	□24,4	□26,3	□29	□33,1
	NaJ	□36,7	□38,1	□35,3	□38,6	□38,0

De acuerdo con esto, para sales seleccionadas las concentraciones más altas de la proteína soluble fueron de aproximadamente

8,8 mg/ml	a 37°C	en presencia de	2,5 M	NaCl,
12,2 mg/ml	a 0°C	en presencia de	2 M	NaCl,
4,2 mg/ml	a 37°C	en presencia de	2 M	KCl,
7,5 mg/ml	a 0°C	en presencia de	1,5 M	KCl,
22,3 mg/ml	a 37°C	en presencia de	5 M	LiCl,
26,3 mg/ml	a 0°C	en presencia de	5 M	LiCl,
33,1 mg/ml	a 37°C	en presencia de	5 M	NaBr,
40 mg/ml	a 0°C	en presencia de	3 M	NaBr,
38,6 mg/ml	a 37°C	en presencia de	4,5 M	NaJ, y
>45 mg/ml	a 0°C	en presencia de	5 M	NaJ.

5

La termolisina es una proteasa agresiva que sufre un ataque autoproteolítico cuando está en solución. De este modo, tanto los preparados cristalizados como los liofilizados de termolisina, así como las soluciones de tales preparados contienen cantidades de diferentes fragmentos autoproteolíticos de la termolisina.

10 Para limitar el ataque autoproteolítico, se aplican temperaturas bajas a las soluciones que contienen termolisina. No obstante, la actividad enzimática sólo se reduce (es decir, parte de la actividad proteolítica sigue presente) bajo tales condiciones, y no se consigue una detención completa. En este sentido, se observa que Inouye, K. et al. (J Biochem., visto con anterioridad) determinan el contenido de proteína de las soluciones sin ningún paso de purificación. Por consiguiente, las concentraciones de proteína detectadas se corresponden con mezclas de

15 termolisina intacta y fragmentos de degradación de la misma.

En vistas del estado de la materia, un objetivo de la presente invención es la proporción de métodos y composiciones con una forma estabilizada de termolisina en una solución acuosa. Mediante la proporción de una forma estabilizada, se reduce la tendencia de la termolisina a precipitar y las soluciones de la enzima se mantienen en un estado homogéneo durante un tiempo prolongado.

20

Sorprendentemente, los inventores han observado que la disolución de la termolisina, primero en un tampón con una baja concentración iónica y luego añadiendo una sal y disolviendo la sal en la solución que ya contenía la termolisina, permite la formación de una solución con una concentración alta de termolisina. Al mismo tiempo, bajo

25 tales condiciones de acuerdo con la invención, se estabiliza la termolisina disociada en la solución, es decir, la solución permanece clara durante una cantidad de tiempo mayor, durante el que no se forma precipitado alguno.

La invención proporciona un beneficio significativo cuando se deben mantener cantidades de termolisina en solución para dispensar alícuotas de la misma, o para hacer mezclas con preparaciones de otras enzimas, tales como

30 enzimas colagenasa. Tales mezclas de enzimas proteolíticas se utilizan particularmente en la disociación de tejido orgánico para la separación de subtipos de células del tejido.

### Resumen de la invención

35 De acuerdo con la invención, se proporciona un método para preparar una solución de termolisina (EC 3.4.24.27) en el que la termolisina disuelta se encuentra en una forma estabilizada, y el método incluye el primer paso (P) que consiste en mezclar un preparado sólido que incluye termolisina con un disolvente acuoso, y preparar una primera solución, en la que el preparado sólido incluye termolisina a una concentración de aproximadamente el 20%

40 [peso/peso] o mayor, y en la que la primera solución incluye (i) una sal tampón capaz de mantener un pH en el rango de entre 4,5 y 9, (ii) una o más sales, y (iii) termolisina, y en la primera solución la concentración del preparado que incluye la termolisina en el disolvente acuoso se encuentra entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la concentración del agregado de una o más sales que incluyen la(s) sal(es) tampón se encuentra entre aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, en el que el método también incluye el paso subsiguiente (Q) de adición a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona a partir del grupo que

45 incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas, y la disolución de la sal adicional, en el que la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida tras el paso (Q) se encuentra entre aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M, preparando así una segunda solución en la que la termolisina disuelta se encuentra en una forma estabilizada.

50 También se describe una composición líquida que incluye agua, termolisina en una forma disociada, una sal tampón disociada capaz de mantener el pH en el rango de entre un pH de 4,5 y un pH de 9, y un sal disociada seleccionada a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas, en la

que la composición es una solución homogénea durante cinco horas o más, y la composición contiene termolisina a una concentración comprendida entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.

5 Adicionalmente, se describe una composición líquida que incluye agua, termolisina en una forma disociada, una sal tampón disociada capaz de mantener el pH en el rango de entre un pH de 4,5 y un pH de 9, y un sal disociada seleccionada a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas, en la que la composición es una solución homogénea durante cinco horas o más, y la composición contiene termolisina a una concentración comprendida entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 23 mg/ml.

10 Adicionalmente, se describe la utilización de una composición de acuerdo con la invención para el almacenamiento, transporte o dispensación de termolisina en su forma disociada.

#### Descripción detallada de la invención

15 Ciertos términos se utilizan con un significado particular o se definen por primera vez en esta descripción de la presente invención. Con los fines de la presente invención, los términos utilizados se definen mediante sus definiciones aceptadas en la materia, cuando éstas existan, excepto cuando estas definiciones presenten un conflicto total o parcial con las definiciones proporcionadas a continuación. En caso de que se presente un conflicto en la definición, el significado del término primero se define por cualquiera de las definiciones proporcionadas a  
20 continuación.

El término "contiene" se utiliza en la descripción de la invención y en las reivindicaciones para hacer referencia a que "incluye, pero no se limita necesariamente a ello".

25 Los artículos "un" y "una" se utilizan aquí para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un compuesto" hace referencia a un compuesto o a más de un compuesto.

30 Cuando se designa un rango de valores numéricos, tal como, pero no limitado a, un rango de concentración, el rango se indica mediante un primer valor n1 y un segundo valor n2 (por ejemplo, "un rango entre n1 y n2"). Se entiende que el límite inferior del rango designado es el valor igual o superior al primer valor. Se entiende que el límite superior del rango designado es el valor igual o inferior al segundo valor. Por consiguiente, un valor x en el rango designado se proporciona como  $n1 \leq x \leq n2$ . Cuando un rango se indica mediante la palabra "entre", se entiende que los límites superior e inferior se incluyen en el intervalo. Por consiguiente, la expresión "un valor x entre  
35 n1 y n2" significa que  $n1 \leq x \leq n2$ .

Si no se indica lo contrario, se entiende que el término "aproximadamente" y el carácter "□" en combinación con un valor numérico n ("aproximadamente n", "□n") indica un valor x en el intervalo proporcionado por el valor numérico 65% del valor, es decir  $n - 0,05 * n \leq x \leq n + 0,05 * n$ . En caso que el término "aproximadamente" o el carácter "~" en  
40 combinación con un valor numérico n describa una realización preferible de la invención, el valor de n es el más preferible, si no se indica lo contrario.

Una "mezcla" es una sustancia hecha mediante la combinación de dos o más materiales diferentes sin que ocurra ninguna reacción química. Los objetos no se unen en una mezcla. Habitualmente, una mezcla puede separarse de  
45 nuevo en sus componentes originales. Las mezclas son el producto de una mezcla o combinación mecánica de sustancias químicas tales como elementos y compuestos, sin que exista enlace químico u otro cambio químico, para que cada sustancia ingrediente mantenga su propias propiedades químicas y estructura. Mientras que en una mezcla no existen cambios químicos, las propiedades físicas de una mezcla, tales como su punto de fusión, pueden diferir de las de sus componentes. Las mezclas pueden ser homogéneas o heterogéneas.

50 Las mezclas homogéneas son mezclas que tienen propiedades definidas y consistentes. Las partículas se esparcen de forma uniforme. Por ejemplo, cualquier cantidad de una mezcla determinada tiene la misma composición y propiedades. Una mezcla homogénea es una mezcla uniforme que incluye sólo una fase. Para el fin de la invención, las soluciones de uno a más sales disociadas son ejemplos no limitantes de tales mezclas homogéneas.

55 Una solución es una mezcla homogénea de una o más sustancias (los solutos) disueltas (es decir disociadas) en otra sustancia (el disolvente). Un ejemplo común sería un sólido disuelto en un líquido (es decir, sal o proteína disuelta en agua). La solubilidad es una propiedad del compuesto. En relación a las condiciones, la cantidad de una sustancia que puede disolverse en un disolvente o una solución puede ser variable.

60 Algunos ejemplos no limitantes de mezclas no homogéneas (heterogéneas) son un coloide y una suspensión. En el contexto de la invención, se entiende que una suspensión es un fluido heterogéneo que contiene partículas sólidas que son suficientemente grandes para su sedimentación. A diferencia de los coloides, las partículas suspendidas se depositan después de un tiempo si se mantienen inalteradas. Esto distingue una suspensión de un coloide, en el que  
65 las partículas suspendidas son más pequeñas y no se depositan.

En una solución, la sustancia disuelta no existe como sólido, y el(los) soluto(s) y el disolvente se mezclan de manera homogénea. El término "estabilidad" de una solución hace referencia a la tendencia de la sustancia disuelta de permanecer en el estado disuelto. Es decir, el término hace referencia a la capacidad de la solución de permanecer homogénea durante un intervalo de tiempo determinado. Por consiguiente, la estabilidad puede caracterizarse en forma de cuantificación mediante la determinación de dicho intervalo de tiempo. Así, la sustancia disuelta en una primera solución caracterizada por una estabilidad menor muestra una tendencia mayor a precipitar o formar un coloide o una suspensión, a diferencia de una segunda solución caracterizada por una estabilidad mayor en la que dicha tendencia es menor. Como consecuencia, tras una cierta cantidad de tiempo dicha primera solución se convierte en una mezcla heterogénea, mientras que dicha segunda solución permanece en forma de mezcla homogénea.

Bajo ciertas condiciones, la estabilidad de una solución puede aumentar, es decir, la tendencia de una sustancia disuelta a precipitar se reduce. Con el fin de la presente invención, una sustancia con una tendencia reducida a precipitar se denomina "forma estabilizada".

La turbidez es una medida de la opacidad provocada por la presencia de partículas en una suspensión o un coloide. Existen varias formas prácticas de determinar la turbidez y la más directa es la medida de la atenuación (es decir, la reducción de la fuerza) de la luz tras pasar a través de una columna de agua de muestra. De este modo, un modo de determinar la turbidez es la inspección visual, es decir, la inspección a simple vista.

Otro modo de determinación es la medida de la atenuación de la luz con un fotómetro. En este sentido, el término "densidad óptica" (al que también se denomina "DO") hace referencia a la medida adimensional de la transmitancia de un elemento óptico para una determinada longitud a una determinada longitud de onda  $\lambda$ :

$$DO_{\lambda} = \log_{10} O = - \log_{10} T = - \log_{10} (I/I_0)$$

donde

O = opacidad por unidad  
T = transmitancia por unidad  
I<sub>0</sub> = intensidad del haz de luz incidente  
I = intensidad del haz de luz transmitido

Cuanto mayor es la densidad óptica, menor es la transmitancia. Debido a la dispersión de un haz de luz enfocado sobre las partículas, la densidad óptica de una suspensión o un coloide aumenta en comparación a una solución clara.

Una forma preferible de determinar la turbidez es la medición de la luz dispersada. Con este fin, con frecuencia se utiliza el fotómetro de dispersión de luz. En relación a la dirección desde la que se detecta y cuantifica la dispersión de la luz existen varios tipos de fotómetros de luz dispersada en la materia. En principio, todos ellos pueden utilizarse para la evaluación cuantitativa de la turbidez en muestras líquidas. El término "dispersión de luz" incluye de forma colectiva tanto la dispersión de las ondas de luz mediante las partículas en la muestra, así como la reflexión por parte de la materia particulada de la muestra. La retrodispersión se define como menor a 90°, hacia la fuente de luz. La dispersión frontal se define como menor a 90° respecto a, o en la misma dirección general a la fuente de luz. La mayoría de unidades de turbidez de medida que se utilizan hoy en día se basan en técnicas de medición de dispersión del lado de los 90°.

La intensidad de la luz dispersada depende de la cantidad de la materia no disuelta (particulada) en la mezcla heterogénea y puede describirse mediante la fórmula I:

$$F = I_0 \cdot \Phi \cdot (2.303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d) \quad (\text{fórmula I})$$

en la que

F es la intensidad de la luz dispersada  
I<sub>0</sub> es la intensidad del haz de luz entrante  
Φ es la proporción de fotones emitidos frente a los absorbidos  
ε es el coeficiente de absorción molar de la sustancia particulada de la mezcla  
c es la cantidad de sustancia particulada por volumen de muestra líquida (mezcla heterogénea) en la cubeta  
d es el grosor del espacio en la cubeta

Con el fin de la invención, se llevan a cabo mediciones de dispersión del lado de los 90° con un fotómetro de fluorescencia para determinar la opacidad de las mezclas heterogéneas que contienen termolisina como materia particulada. Habitualmente, tales mezclas son coloides.

La "termolisina en bruto" en el sentido de la invención es una mezcla de proteínas que principalmente incluye termolisina sustancialmente no degradada (= intacta) y, de forma adicional, productos de degradación que resultan típicamente del ataque autoproteolítico. Habitualmente, aproximadamente el 70% de la termolisina en bruto se encuentra de forma sustancialmente no degradada, mientras que aproximadamente el 24% de la termolisina en bruto está formada por productos de degradación diferentes que retienen la actividad proteolítica (en diferentes grados), y aproximadamente el 6% está formado por fragmentos proteolíticamente inactivos e impurezas adicionales. THERMOASE es una preparación de termolisina en bruto que se utiliza para ejemplificar los efectos ventajosos de la presente invención. No obstante, la presente invención no se limita a la utilización de preparaciones de THERMOASE, y pueden utilizarse otras preparaciones de la enzima para ejecutar la invención.

THERMOASE es un liofilizado con un contenido de proteínas que se encuentra entre aproximadamente el 30% [peso/peso] y aproximadamente el 35% [peso/peso]. La proteína en el liofilizado incluye "termolisina en bruto".

A partir del estado de la materia se sabe que la solubilidad de la termolisina aumenta si el tampón acuoso que se utiliza como disolvente de la termolisina seca, o de una composición seca que incluye termolisina, incluye una sal, preferiblemente una sal neutra disociada. Sin embargo, las soluciones acuosas de la termolisina son inestables debido a que la termolisina disuelta sufre una transición que reduce su solubilidad. La naturaleza precisa de la transición no está clara pero se puede especular razonablemente que el residuo de aminoácido de uno o más de un dominio hidrófobo de la termolisina juega un papel en este proceso. Debido a la transición, la solubilidad de la termolisina disminuye. Como resultado, una solución clara de la enzima recién preparada se vuelve opaca y una porción sustancial de la proteína precipita eventualmente. Un ejemplo para la falta de estabilidad se proporciona en el ejemplo 6, tablas 13 y 14, N° 1-3. Incluso a concentraciones reducidas y en presencia de aproximadamente 1,1 M de NaCl, la termolisina tiene una fuerte tendencia a precipitar tras formar una solución.

Los inventores han observado que, sorprendentemente, la transición puede suprimirse y la termolisina puede estabilizarse en solución. Con este fin, se pone en contacto la termolisina, la termolisina en bruto o un liofilizado que contiene termolisina y una o más sales con un tampón acuoso con una concentración salina baja para formar una solución estable sólo durante un intervalo de tiempo corto. Subsiguientemente, se añade una sal adicional en forma sólida y luego se disocia en la solución. Tras este paso, la termolisina en solución se presenta en forma estabilizada, lo cual se caracteriza por una tendencia a precipitar significativamente reducida.

De acuerdo con la invención, antes de que el tampón acuoso con una concentración salina baja se ponga en contacto con la termolisina, la termolisina en bruto o un liofilizado que contiene termolisina, la concentración de las sales disociadas, incluyendo la sal tampón, en el tampón es preferiblemente menor de 150 mM, preferiblemente en el rango de entre 0,1 mM y 150 mM. En relación a la preparación de la termolisina, la concentración salina del tampón acuoso aumenta hasta que la sal presente en la preparación sólida que contiene termolisina se disocia en el tampón.

Preferiblemente, la sal en forma sólida es una sal neutra con la excepción de una sal de sulfato inorgánico. Una sal sólida preferible se selecciona a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas.

El primer paso principal es la formación de una solución clara que contiene termolisina. En el caso que el preparado de termolisina no permita formar una solución clara homogénea, se necesita un paso adicional de aclarado. Por ejemplo, la solución puede aclararse mediante filtración, centrifugación o medios equivalentes.

Como segundo paso principal, la sal en forma sólida debe añadirse a la solución de termolisina clara recién preparada. A una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, la sal en forma sólida se añade preferiblemente no más de 30 min. después de la obtención de la solución de la termolisina clara. Los periodos más cortos, tales como no más de 15 min., 10 min. y 5 min., son más preferibles.

Mediante la utilización en la solución de termolisina de una concentración total de entre aproximadamente 1,5 M y 3,5 M de la sal disociada, la termolisina en solución se vuelve estable y la solución se mantiene en forma de mezcla homogénea clara durante hasta 16 horas o incluso más.

Sorprendentemente, esta solución incluso puede diafiltrarse frente a un tampón con una concentración salina menor; en tal proceso, puede disminuirse la concentración de la sal disociada que se añadió previamente (véase el ejemplo 2). La diafiltración en este sentido es un proceso de filtración de flujo cruzado que permite la transferencia de especies de bajo peso molecular, agua y/o disolventes a través de una membrana sin cambiar el volumen de la solución. Este proceso se utiliza para purificar especies de alto peso molecular retenidas (es decir, termolisina sustancialmente intacta), mientras que se sustraen las especies de bajo peso molecular que incluyen los fragmentos proteolíticos de la termolisina. Al mismo tiempo, el procedimiento de diafiltración permite el intercambio de tampón, simplemente cambiando así las propiedades de una solución determinada con anterioridad al proceso de diafiltración.

Incluso bajo esas condiciones (es decir, durante un proceso de diafiltración) la termolisina se mantiene en una forma estabilizada, es decir, la termolisina se mantiene estable en solución.

5 Se observa el mismo efecto para soluciones de termolisina congeladas de acuerdo con la invención después de descongelarse.

10 Por consiguiente, la invención proporciona particularmente los medios, compuestos y condiciones para manipular soluciones homogéneas de termolisina durante una cantidad mayor de tiempo bajo condiciones reproducibles. Esto es particularmente útil cuando la termolisina se mezcla con otras enzimas o cuando las soluciones de termolisina se dispensan en forma de alícuotas, por ejemplo mediante la utilización de aparatos automáticos.

Así, en más detalle, la presente descripción incluye los siguientes puntos:

15 1. Un método para preparar una solución de termolisina (EC 3.4.24.27) en la que la termolisina disuelta se presenta en forma estabilizada, y el método incluye el primer paso (P) de mezclar una preparación sólida que incluye termolisina con un disolvente acuoso y preparar una primera solución, en el que la primera solución incluye

- 20 (i) una sal tampón capaz de mantener un pH en el rango de entre un pH de 4,5 y pH de 9,  
 (ii) una o más sales, y  
 (iii) termolisina,

25 y en la primera solución la concentración total de una o más sales que incluyen la sal tampón o las sales tampón se encuentra en el rango de entre aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y

en el que el método también incluye el subsiguiente paso (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas, y disolver la sal adicional,

30 para preparar así una segunda solución en la que la termolisina disuelta se presenta en forma estabilizada.

2. El método de acuerdo con el artículo 1, en el que la primera solución obtenida en el paso (P) es una solución homogénea.

35 3. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 y 2, en el que en el paso (P) el disolvente acuoso incluye agua y una sal tampón.

40 4. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1 y 2, en el que en el paso (P) el preparado sólido que incluye termolisina también incluye una o más sales.

5. El método de acuerdo con el artículo 4, en el que en el paso (P) el disolvente acuoso es agua.

45 6. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-5, en el que en el paso (P) el preparado sólido incluye termolisina a una concentración de aproximadamente el 20% [peso/peso] o mayor.

50 7. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-5, en el que en el paso (P) el preparado sólido incluye termolisina a una concentración en el rango de entre aproximadamente el 20% [peso/peso] y el 100% [peso/peso], más preferible en el rango de entre aproximadamente el 20% [peso/peso] y aproximadamente el 80% [peso/peso], y aún más preferible en el rango de entre aproximadamente el 20% [peso/peso] y aproximadamente el 60% [peso/peso].

55 8. El método de acuerdo con el artículo 6 o el artículo 7, en el que en el paso (P) el preparado sólido incluye termolisina a una concentración en el rango de entre aproximadamente el 20% [peso/peso] y aproximadamente el 50% [peso/peso], más preferible en el rango de entre aproximadamente el 20% [peso/peso] y aproximadamente el 40% [peso/peso], y aún más preferible en el rango de entre aproximadamente el 20% [peso/peso] y aproximadamente el 30% [peso/peso].

60 9. El método de acuerdo con el artículo 8, en el que en el paso (P) el preparado sólido incluye termolisina a una concentración de aproximadamente el 20% [peso/peso].

10. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-9, en el que en el paso (P) la concentración del preparado que incluye termolisina en el disolvente acuoso se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml.

65 11. El método de acuerdo con el artículo 10, en el que en el paso (P) la concentración del preparado sólido se encuentra en el rango de entre aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 60 mg/ml, y más preferible en el

rango de entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, y aún más preferible aproximadamente 30 mg/ml.

5 12. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-11, en el que en el paso (P) una o más sales (ii) en la primera solución incluyen una sal seleccionada a partir del grupo que incluye NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y una combinación de las mismas.

10 13. El método de acuerdo con el artículo 4, en el que en el paso (P) una o más sales en el preparado sólido que incluye termolisina se seleccionan a partir del grupo que incluye NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y una combinación de las mismas.

15 14. El método de acuerdo con el artículo 13, en el que en el paso (P) el preparado sólido contiene NaCl en el rango de entre aproximadamente el 50% [peso/peso] y aproximadamente el 70% [peso/peso], y/o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el rango de entre aproximadamente el 0,5% [peso/peso] y aproximadamente el 7,5% [peso/peso], y más preferible el preparado sólido contiene NaCl en el rango de entre aproximadamente el 60% [peso/peso] y aproximadamente el 65% [peso/peso], y/o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el rango de entre aproximadamente el 3% [peso/peso] y aproximadamente el 6% [peso/peso].

20 15. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 12-14, en el que en el paso (P) el preparado sólido contiene termolisina en bruto.

25 16. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-15, en el que en el paso (P) la concentración de iones de sulfato en la primera solución se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, más preferible la concentración de iones sulfato en la primera solución es de aproximadamente 5 mM.

30 17. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-16, en el que en el subsiguiente paso (Q) la sal adicional se añade en forma sólida.

35 18. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-17, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M.

40 19. El método de acuerdo con el artículo 18, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 3,5 M.

45 20. El método de acuerdo con el artículo 19, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 2,5 M.

50 21. El método de acuerdo con el artículo 19, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) es de aproximadamente 2,3 M.

55 22. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 17-21, en el que la concentración de iones sulfato en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) es menor de aproximadamente 10 mM.

60 23. El método de acuerdo con el artículo 22, en el que la concentración de iones sulfato en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, más preferible en el rango de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 5 mM.

65 24. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-23, en el que en la primera solución obtenida en el paso (P) la concentración total de una o más sales, que incluyen la sal o sales tampón, se encuentra en el rango de entre aproximadamente 100 mM y 500 mM, más preferible en el rango de entre aproximadamente 300 mM y 400 mM.

70 25. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-24, en el que en el paso (P) el disolvente acuoso incluye iones de Ca<sup>2+</sup>.

75 26. El método de acuerdo con el artículo 25, en el que en el disolvente acuoso la concentración de iones de Ca<sup>2+</sup> se encuentra en el rango de entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM, aún más preferible en el rango de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM.

80 27. El método de acuerdo con el artículo 26, en el que en el disolvente acuoso la concentración de iones de Ca<sup>2+</sup> es de aproximadamente 5 mM.

28. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-27, en el que en el paso (P) el disolvente acuoso incluye una sal tampón a una concentración en el rango de entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 100 mM, y más preferible en el rango de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM.
- 5 29. El método de acuerdo con el artículo 28, en el que en el disolvente acuoso la concentración de la sal tampón se encuentra en el rango de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM.
30. El método de acuerdo con el artículo 29, en el que en el disolvente acuoso la concentración de la sal tampón se encuentra en el rango de entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 25 mM.
- 10 31. El método de acuerdo con el artículo 30, en el que en el disolvente acuoso la concentración de la sal tampón es de aproximadamente 20 mM.
- 15 32. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 28 a 31, en el que la sal tampón se selecciona a partir del grupo que incluye BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfónico), Tris (tris(hidroximetil)aminometano), BisTris (Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano), BisTris propano (1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino) propano), HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)-piperacín-N'-2-etansulfónico), MES (ácido 2-(N-morfolin)etansulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolin)propansulfónico), MOPSO (ácido 3-morfolin-2-hidroxipropansulfónico), PIPES (ácido piperacín-1,4-bis(2-etansulfónico)), TAPS (ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropansulfónico), TES (ácido N-Tris(hidroximetil)metil-2-aminetansulfónico), TEA (trietanolamina), y tricína (N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina).
- 20 33. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-32, en el que en el paso (P) el pH de la primera solución se encuentra en el rango de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,5.
- 25 34. El método de acuerdo con el artículo 33, en el que el pH es de aproximadamente 7,5.
- 35 35. El método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-34, en el que en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) la concentración de termolisina sustancialmente intacta es de aproximadamente 5 mg/ml o mayor, y en el que la termolisina en solución se presenta en forma estabilizada.
- 30 36. El método de acuerdo con el artículo 35, en el que en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) la concentración de termolisina sustancialmente intacta es de aproximadamente 5 mg/ml o mayor, y menor de aproximadamente 35 mg/ml.
- 35 37. El método de acuerdo con el artículo 35, en el que la sal adicional se selecciona a partir del grupo que incluye KCl, LiCl, NaCl, NaBr, NaJ, NaNO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas.
- 40 38. El método de acuerdo con el artículo 37, en el que la concentración de termolisina en una forma estabilizada es de aproximadamente 10 mg/ml o mayor, y menor de aproximadamente 35 mg/ml.
- 45 39. El método de acuerdo con el artículo 38, en el que la concentración de termolisina en una forma estabilizada es de aproximadamente 20 mg/ml.
- 50 40. Una composición líquida que incluye agua, termolisina en una forma disociada, una sal tampón disociada capaz de mantener un pH en el rango de entre 4,5 y 9, y una sal disociada seleccionada a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas, en la que la composición contiene termolisina a una concentración en el rango de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.
- 55 41. Una composición líquida que incluye agua, termolisina en una forma disociada, una sal tampón disociada capaz de mantener un pH en el rango de entre 4,5 y 9, y una sal disociada seleccionada a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas, en el que la composición es una solución homogénea durante cinco horas o más, y la composición contiene termolisina a una concentración en el rango de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 23 mg/ml.
- 60 42. La composición líquida de acuerdo tanto con el artículo 40 como con el artículo 41, y la composición líquida se obtiene mediante un método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-39.
- 65 43. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 40-42, en el que la termolisina disociada se presenta en forma estabilizada.
44. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 40-43, en la que la turbidez de la composición aproximadamente equipara la turbidez de una solución de referencia a una temperatura en el rango de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C y al menos cinco horas después de la formación de la composición, en la que dicha solución de referencia está compuesta por los mismos ingredientes

disociados a las mismas concentraciones respectivas que la composición de acuerdo con cualquiera de los artículos 41 y 42, y en la que la solución de referencia no tiene termolisina o fragmentos de la misma.

5 45. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 40-44, obtenida mediante un método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-39 e incubada a una temperatura en el rango de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, y dicha composición es una solución homogénea en un intervalo de incubación de 0-5 horas, aún más preferible en un intervalo de incubación de más de 5 horas.

10 46. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 44 y 45, en el que la termolisina disociada es sustancialmente intacta.

15 47. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 44-46, en la que la turbidez de la composición aproximadamente equipara la turbidez de una solución de referencia a una temperatura en el rango de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C y al menos cinco horas después de la formación de la composición, en la que dicha solución de referencia está compuesta de los mismos ingredientes disociados a las mismas concentraciones respectivas que la composición de acuerdo con cualquiera de los artículos 44-46, y en la que la solución de referencia no tiene termolisina o fragmentos de la misma.

20 48. Una composición líquida que incluye agua, termolisina en una forma disociada, una sal tampón disociada capaz de mantener un pH en el rango de entre 4,5 y 9, y NaCl disociado a una concentración menor de 500 mM, y en la que la composición contiene termolisina a una concentración en el rango de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.

25 49. La composición líquida de acuerdo con el artículo 48, en la que el pH de la composición se encuentra en el rango de entre 7 y 8, aún más preferible a aproximadamente un pH de 7,5.

30 50. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 48 y 49, en la que la composición incluye iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , más preferible iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración en el rango de entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM, y aún más preferible en el rango de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM.

35 51. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 48-50, en la que en la composición la concentración total de las sales disociadas, que incluyen la sal o sales tampón, se encuentra en el rango de entre aproximadamente 400 mM y aproximadamente 200 mM, y más preferible la concentración total de las sales disociadas, que incluyen la sal o sales tampón, es de aproximadamente 200 mM.

40 52. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 48-51, en el que en la composición la concentración de iones de sodio disociados se encuentra en el rango de entre 100 mM y 250 mM, más preferible la concentración de iones de sodio disociados se encuentra en el rango de entre 150 mM y 200 mM, y aún más preferible la concentración de iones de sodio disociados es de aproximadamente 170 mM.

53. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 48-52, en el que la conductividad de la composición es de aproximadamente 20 mS/cm.

45 54. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 48-53, en el que en la composición la concentración de termolisina sustancialmente intacta se encuentra en el rango de entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, más preferible en el rango de entre 1 mg/ml y 7,5 mg/ml, y aún más preferible entre 1 mg/ml y 5 mg/ml, aún más preferible 2,5 Mg/ml o 5 mg/ml.

50 55. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 48-54, y la composición líquida se obtiene mediante el método de acuerdo con cualquiera de los artículos 1-39, seguido por un paso subsiguiente de diafiltración de la segunda solución obtenida tras el paso (Q) frente a un tampón de diafiltración que contiene una sal tampón disociada capaz de mantener un pH en el rango de entre 4,5 y 9, y NaCl disociado a una concentración menor de 500 mM.

55 56. La composición líquida de acuerdo con el artículo 55, en la que el tampón de diafiltración incluye iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración en el rango de entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM.

60 57. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 55 y 56, en la que en el tampón de diafiltración la concentración total de sales disociadas, que incluyen la sal o sales tampón, se encuentra en el rango de entre aproximadamente 400 mM y aproximadamente 200 mM, y más preferible la concentración total de las sales disociadas, que incluyen la sal o sales tampón, es de aproximadamente 200 mM.

65 58. La utilización de una composición líquida de acuerdo con cualquiera de los artículos 40-57 para el almacenamiento, transporte o dispensación de termolisina, en la que la termolisina se encuentra en forma disociada.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención, el verdadero ámbito de la cual se describe en las reivindicaciones anejas. Se entiende que se pueden llevar a cabo modificaciones en los procedimientos descritos sin apartarse del espíritu de la invención.

5 Descripción de las figuras

Figura 1 Resultados de un escaneo de longitud de onda, tal y como se describe en el ejemplo 8. Las ordenadas indican la intensidad de luz en unidades arbitrarias (a.u.) medida mediante el detector a 800 nm. Las abscisas indican la longitud de onda de la luz entrante. (A) muestra líquida que contiene el tampón acuoso; (B) muestra líquida que incluye el coloide de termolisina en el tampón acuoso.

Figura 2 Resultado ejemplar de un análisis cromatográfico de una solución que contiene el liofilizado THERMOASE obtenido en el primer paso descrito en el ejemplo 2, es decir sin/antes de un paso adicional de diafiltración. El liofilizado THERMOASE se disolvió en un tampón acuoso que contenía 2,3 M de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM de HEPES, pH de 7,5; el contenido de proteínas de la solución fue de 8,2 mg/ml tal y como se determina fotométricamente a 280 nm. La figura muestra un cromatograma HPLC de una muestra de 50  $\mu$ l de la solución homogénea. Se marcan cinco áreas pico denominadas (i)-(v). Las condiciones y los parámetros de la HPLC se describen en el ejemplo 2. Ordenadas: mA.U.; abscisas: tiempo de retención en [min.].

Figura 3 Resultado ejemplar de un análisis cromatográfico de una solución que contiene el liofilizado THERMOASE obtenido en el segundo paso descrito en el ejemplo 2, es decir incluyendo/después del paso de diafiltración. Tras la diafiltración, la THERMOASE se disolvió en un tampón acuoso que contenía 170 mM de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM de HEPES, pH de 7,5; el contenido de proteínas de la solución tras la diafiltración fue de 4,9 mg/ml tal y como se determina fotométricamente a 280 nm. La figura muestra un cromatograma HPLC de una muestra de 50  $\mu$ l de la solución homogénea. Se marcan tres áreas pico denominadas (vi)-(viii). Las condiciones y los parámetros de la HPLC se describen en el ejemplo 2. Ordenadas: mA.U.; abscisas: tiempo de retención en [min.].

### 30 Ejemplo 1

#### Preparación de las mezclas de un tampón acuoso y termolisina a partir del preparado THERMOASE

35 De acuerdo con la información proporcionada por el fabricante, aproximadamente entre el 60-65% [peso/peso] del liofilizado fue NaCl. Además, el liofilizado contenía aproximadamente un 5% [peso/peso] de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (decahidrato). Una cantidad de entre aproximadamente el 30% [peso/peso] y aproximadamente el 35% [peso/peso] del liofilizado THERMOASE utilizado aquí así como en los ejemplos consistió en termolisina en bruto (véase también el ejemplo 2). Todos los pasos de trabajo descritos más adelante se llevaron a cabo a una temperatura de entre 2°C y 8°C, si no se indica lo contrario.

Se preparó un volumen de 8 l del tampón acuoso (A) que contenía 2 M de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH de 7,5. Se mezcló una cantidad de 200 g de liofilizado THERMOASE con el tampón acuoso y la mezcla se agitó continuamente. No obstante, no se obtuvo una mezcla homogénea, la mezcla permaneció turbia y nunca se volvió completamente clara. Aproximadamente 60 min. después de la adición del liofilizado, la mezcla se volvió crecientemente opaca y la termolisina empezó a precipitar.

45 Sorprendentemente, puede evitarse la formación de una mezcla no homogénea, tal y como se obtiene con el tampón (A), disolviendo primero el preparado de THERMOASE en un tampón con una fuerza iónica baja y añadiendo sal luego. Por consiguiente, se prepara un volumen de 6,5 l del tampón acuoso (B) que contiene 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM de HEPES, pH de 7,5. Se disolvió una cantidad de 200 g del liofilizado seco THERMOASE en el tampón (B) y se obtuvo una solución clara. Subsiguientemente, como segundo paso, se añadieron 935 g de NaCl sólido y se disolvieron en la solución. Como tercer paso, el volumen de la solución se ajustó a 8 l mediante la adición de un volumen adicional del tampón acuoso (B) y se mezcló mediante agitación. Se obtuvo una solución homogénea.

55 Teniendo en cuenta que aproximadamente el 60-65% [peso/peso] del liofilizado está formado por NaCl, la concentración final de NaCl en la solución fue de aproximadamente 2,3 M. La concentración final de termolisina en bruto en la solución fue de entre aproximadamente 7,5 mg/ml y 8,8 mg/ml, que se corresponden a una concentración de termolisina sustancialmente no degradada de aproximadamente 5,7 mg/ml (en el rango de entre aproximadamente 5,2 mg/ml y 6,1 mg/ml).

Tabla 5

Concentraciones calculadas de ingredientes de THERMOASE en el proceso de solubilización; primer paso: liofilizado THERMOASE disuelto en un volumen de 6,5 l, con anterioridad a la adición de NaCl sólido
---

Ingrediente	Concentración
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
HEPES, pH de 7,5	20 mM
NaCl	□329 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	□5 mM
Sales y sales tampón	□359 mM
Termolisina en bruto	□10 mg/ml
Termolisina intacta	□7 mg/ml

Tabla 6

Concentraciones calculadas de sales, incluyendo las sales tampón, en el proceso de solubilización; segundo paso: volumen de 6,5 l, tras la adición de NaCl sólido	
Ingrediente	Concentración
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
HEPES, pH de 7,5	20 mM
NaCl	□2790 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	□5 mM
Sales y sales tampón	□2820 mM

Tabla 7

Concentraciones finales calculadas de THERMOASE e ingredientes de sal en el proceso de solubilización; tercer paso: volumen ajustado de 8 l	
Ingrediente	Concentración
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
HEPES, pH de 7,5	20 mM
NaCl	□2267 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	□4 mM
Sales y sales tampón	□2296 mM
Termolisina en bruto	□8,1 mg/ml
Termolisina intacta	□5,7 mg/ml

5

## Ejemplo 2

Estabilidad de las soluciones de termolisina con una concentración reducida de NaCl

10 Primero, se preparó una solución del liofilizado THERMOASE mediante la utilización del tampón (B) y el procedimiento en tres pasos descrito en el ejemplo 1. En un paso subsiguiente se diafiltró la solución, en la que se cambió el tampón de la composición líquida por 20 mM de HEPES, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 170 mM de NaCl, pH de 7,5. Sorprendentemente, la termolisina permaneció estabilizada, es decir la solución diafiltrada permaneció homogénea durante 5 horas e incluso más de 5 horas.

15 El análisis HPLC de la solución del liofilizado THERMOASE se llevó a cabo antes y después de la diafiltración mediante la utilización de una HPLC con una columna SUPERDEX™ de 75pg 10 mm / 300 mm GL (GE Bioscience) como fase estacionaria. La fase móvil fue un tampón acuoso que contenía 200 mM de NaCl, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 50 mM de HEPES, pH de 7,5. Los volúmenes de las muestras fueron de 50 □l cada una. La tasa de flujo fue de 0,5 ml/min. y cada ejecución de la HPLC se llevó a cabo durante 80 min. La unidad de detección fue un detector de absorbancia UV-Vis a 280 nm.

25 En cada muestra se eludió el pico principal con un tiempo de retención medio de aproximadamente 27 min. 34 s. (véanse los picos en el área (i) que se muestra en la figura 2 y en el área (vi) que se muestra en la figura 3).

30 De manera típica, las muestras analizadas tras el primer paso (sin diafiltración) mostraron picos que se pudieron agrupar en cinco áreas diferentes, tal y como se muestra en la figura 2. El área bajo el pico principal (denominado (i)) refleja la termolisina sustancialmente no degradada (= intacta). Se asumió que el hombro del pico que corresponde a la elución tras un tiempo de retención de aproximadamente 20 min. 15 s. reflejaba los dímeros de termolisina. Los picos bajo las áreas denominadas (ii), (iii), y (iv) correspondieron principalmente a los productos de degradación de la termolisina. Los picos bajo el área denominada (v) reflejaron principalmente fragmentos de termolisina mucho más degradados (en diferentes grados), así como impurezas.

35 Las muestras analizadas tras el segundo paso, es decir tras la diafiltración, proporcionaron los resultados que se muestran ejemplarmente en la figura 3. Especialmente, la cantidad relativa de fragmentos de degradación e impurezas correspondiente a las áreas pico denominadas (vii) y (viii) se redujo en las preparaciones diafiltradas. Además, el pico principal en el área designada (vi) habitualmente fue muy diferente cuando se compara con su

homólogo en la figura 2. Así, el cromatograma tras la diafiltración indicó una separación y purificación sustancial de la termolisina no degradada.

Tabla 8

Caracterización de los picos y cuantificación de las áreas de pico de la figura 2				
Nº del área de pico	Tiempo de retención [min.]	Altura [mA.U.]	Área [mA.U. * min.]	Área de pico relativa [%]
(i)	27,56	42,381	88,655	72,19
(ii)	31,33	0,679	2,658	2,16
(iii)	33,59	2,810	11,595	9,44
(iv)	38,60	3,074	7,692	6,26
(v)	41,27	2,479	12,201	9,94
	Σ	51,423	122,801	100,00

5

Tabla 9

Caracterización de los picos y cuantificación de las áreas de pico de la figura 3				
Nº del área de pico	Tiempo de retención [min.]	Altura [mA.U.]	Área [mA.U. * min.]	Área de pico relativa [%]
(vi)	27,57	33,257	71,322	95,01
(vii)	31,61	0,460	2,906	3,87
(viii)	50,39	0,418	0,837	1,11
	Σ	34,135	75,065	100,00

Para una evaluación adicional, se prepararon dos soluciones de almacenamiento diferentes de termolisina (i) 5 mg/ml y (ii) 2,5 mg/ml, en las que con ambas concentraciones el tampón acuoso se ajustó a 20 mM de HEPES, 5 de mM CaCl<sub>2</sub>, 170 mM de NaCl, pH de 7,5 mediante diafiltración; la conductividad del tampón con la termolisina disuelta fue de aproximadamente 20 mS/cm. Se esterizaron las dos soluciones mediante la filtración estéril y se dispensaron en alícuotas.

Desde el momento en el que se disolvió el liofilizado en el primer tampón acuoso hasta que se obtuvieron las alícuotas de las dos soluciones de almacenamiento, la termolisina permaneció disociada en solución durante aproximadamente 6 h. Ambas soluciones de almacenamiento permanecieron claras a lo largo del proceso.

Además, se disolvió una cantidad de 5 mg del liofilizado THERMOASE en 1 ml de un tampón acuoso que contenía 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y 5 mM de HEPES, pH de 7,5. Se analizó una alícuota de 50 ml mediante HPLC bajo condiciones estándar (véase anteriormente) utilizando una columna Superdex<sup>®</sup> 75 10/300, una velocidad de la bomba de 0,5 ml/min. y una detección UV/Vis a 280 nm. La fase móvil fue 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 200 mM de NaCl, 50 mM de HEPES, pH de 7,5 en agua. El pico de termolisina se cuantificó en relación a los otros picos obtenidos. Mediante la utilización de este enfoque, se determinó la cantidad relativa de termolisina sustancialmente intacta en varios lotes de THERMOASE. Cuatro determinaciones independientes indicaron que, de promedio, aproximadamente el 70% de la fracción proteica de THERMOASE era termolisina intacta. Los valores individuales observados fueron 59%, 72%, 71 % y 76%.

Una cantidad ejemplar de 100 g del liofilizado THERMOASE contuvo aproximadamente 33 g de termolisina en bruto, aproximadamente 65 g de NaCl y aproximadamente 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se observó una variación del contenido proteico en los preparados de THERMOASE en el rango de entre 30 g y 35 g por cada 100 g del liofilizado. Habitualmente, la fracción de termolisina sustancialmente no degradada y enzimáticamente activa con un peso molecular de aproximadamente 34.600 Da (también denominada "termolisina") fue de aproximadamente el 23% en el liofilizado seco. La cantidad restante de aproximadamente el 10% de proteínas en el liofilizado seco consistió principalmente en productos de degradación de la termolisina, de los cuales aproximadamente el 80% mantuvo la actividad proteolítica. El remanente incluyó fragmentos de termolisina mucho más degradados y otras impurezas. Por consiguiente, se entiende que la "termolisina en bruto" en el sentido de la invención es una mezcla proteica que incluye (a) aproximadamente un 70% de termolisina sustancialmente no degradada, (b) aproximadamente un 24% de productos de degradación de la termolisina degradación que mantienen la actividad proteolítica (en diferentes grados), y (c) aproximadamente un 6% de fragmentos proteolíticamente inactivos e impurezas adicionales.

Ejemplo 3

Estabilidad de las soluciones de almacenamiento de termolisina con una concentración reducida de NaCl a diferentes temperaturas

Las alícuotas de las dos soluciones de almacenamiento de termolisina con las concentraciones de (i) 5 mg/ml y (ii) 2,5 mg/ml obtenidas de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 2 (es decir, incluyendo la diafiltración) se incubaron a diferentes temperaturas. La turbidez se evaluó en intervalos de 30 min. mediante la inspección visual y

las mediciones se describieron en el ejemplo 9. Se registró el tiempo de exposición a la temperatura respectiva antes de que una solución se volviera turbia. Los resultados se resumen en la tabla 10.

5 Hasta el momento, todos los pasos de trabajo se llevaron a cabo a 8°C o menos, es decir, a temperaturas en el rango de entre 2°C y 8°C. Ambas soluciones de almacenamiento permanecieron claras a lo largo del proceso.

Tabla 10

Concentraciones de termolisina, temperaturas y tiempo durante el que la solución de termolisina permaneció clara		
Temperatura	Concentración de termolisina en 20 mM de HEPES, 5 mM de CaCl <sub>2</sub> , 170 mM de NaCl, pH de 7,5	
	2,5 mg/ml	5 mg/ml
Tiempo de permanencia de la solución homogénea (clara)		
0 °C	21 h	8 h
2 °C	21 h	8 h
4 °C	21 h	8 h
6 °C	21 h	8 h
8 °C	21 h	8 h
10 °C	21 h	4 h

Ejemplo 4

10 Estabilidad de las soluciones con una concentración de termolisina de 2,5 mg/ml tras la congelación y descongelación

15 Después de una incubación de 21 h. a 4, 6, 8, y 10°C, las alícuotas que contenían 2,5 mg/ml (véase el ejemplo 3) se congelaron a -20°C y se almacenaron a esa temperatura durante 6 días. Después de descongelarlas, las alícuotas se incubaron a 8°C. Se registró el tiempo de exposición a la temperatura respectiva antes de que una solución se volviera turbia. Los resultados se resumen en la tabla 11.

Tabla 11

Temperaturas de incubación antes de la congelación y tiempo tras la descongelación durante el que la solución de termolisina permaneció clara	
Temperatura antes de la congelación	Tiempo de permanencia de la solución homogénea (clara) tras la descongelación
4 °C	7 h
6 °C	6 h
8 °C	4 h
10 °C	1 h

20 Ejemplo 5

Estabilidad de las soluciones con diferentes concentraciones de termolisina tras la congelación y descongelación

25 Se prepararon las soluciones de almacenamiento con soluciones de termolisina en el rango de entre 1 mg/ml y 5 mg/ml, de modo similar a como se describe en el ejemplo 2. Se congelaron las alícuotas de las soluciones de almacenamiento a -20°C y se almacenaron a esa temperatura durante 7 días. Después de descongelarlas, las alícuotas se incubaron a 8°C. Se registró el tiempo de exposición a la temperatura respectiva antes de que una solución se volviera turbia. Los resultados se resumen en la tabla 12.

30 Ejemplo 6

Tabla 12

Concentraciones de termolisina y tiempo tras la descongelación durante el que la solución de termolisina permaneció clara					
Concentración de termolisina en 20 mM de HEPES, 5 mM de CaCl <sub>2</sub> , 170 mM de NaCl, pH de 7,5					
1 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml	4 mg/ml	5 mg/ml
Tiempo de permanencia de la solución homogénea (clara)					
27 h	27 h	27 h	27 h	7 h	3,5 h

Ejemplo 6

35 Estabilidad de las soluciones que contienen termolisina en presencia de diferentes sales

Se disolvió el liofilizado THERMOASE a las concentraciones de 100, 50, y 25 mg/ml en 20 mM de HEPES, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH de 7,5. Inmediatamente a continuación, se añadió y se disolvió una sal seleccionada a partir del grupo que incluye Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCH<sub>3</sub>COO, NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub> y NaJ. No se añadió ninguna sal como control. La tabla 13 indica

las concentraciones de los iones respectivos en las soluciones, teniendo en cuenta las cantidades presentes en el liofilizado. Debe observarse que los iones presentes en el tampón HEPES no se tienen en cuenta en la tabla.

Tabla 13

Soluciones de termolisina con diferentes sales añadidas								
Nº	Sal añadida	Concentración del liofilizado en [mg/ml]	Termolisina en bruto en [mg/ml]	Termolisina en [mg/ml]	Na <sup>+</sup> ~ [M]	Cl <sup>-</sup> ~ [M]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ~ [M]	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , J <sup>-</sup> [M]
1	-	100	~33	~23	1,125	1,222	0,006	0
2		50	~16,5	~11,5	0,562	0,566	0,003	0
3		25	~8,3	~5,8	0,281	0,288	0,002	0
4	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	~33	~23	5,125	1,222	2,006	0
5		50	~16,5	~11,5	4,562	0,566	2,003	0
6		25	~8,3	~5,8	4,281	0,288	2,002	0
7	NaCH <sub>3</sub> COO	100	~33	~23	3,125	1,222	0,006	2,0
8		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
9		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0
10	NaCl	100	~33	~23	3,125	3,222	0,006	2,0
11		50	~16,5	~11,5	2,562	2,566	0,003	2,0
12		25	~8,3	~5,8	2,281	2,288	0,002	2,0
13	NaBr	100	~33	~23	3,125	1,222	0,006	2,0
14		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
15		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0
16	NaNO <sub>3</sub>	100	~33	~23	3,125	1,222	0,006	2,0
17		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
18		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0
19	NaJ	100	~33	~23	3,125	1,222	0,006	2,0
20		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
21		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0

5

La tabla 14 indica, con respecto a las mezclas proporcionadas en la tabla 13, si se obtuvo una solución homogénea estable (es decir, clara) y durante cuánto tiempo permaneció así. Se evaluó la turbidez mediante la inspección visual y las mediciones que se describen en el ejemplo 9. Los símbolos que se presentan en la tabla indican lo siguiente:

10		Evaluación mediante inspección visual	a.u., medición de la dispersión en el lado de los 90°
	{###}	opaca	901 - >1000 (desbordamiento)
	{00}	turbia	401 - 900
	{o}	levemente turbia	131 - 400
15	{}	clara	0 - 130

Tabla 14

Estabilidad de las soluciones de termolisina en presencia de diferentes sales							
Nº	Sal añadida	[0,1 h.]	[1 h.]	[5 h.]	[10 h.]	[15 h.]	[20 h.]
1	-	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}
		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
2		{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}
		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
3		{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}
		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
4	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}
		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
5		{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}
		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
6		{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}
		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
7	NaCH <sub>3</sub> COO	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}
		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
8		{o}	{o}	{00}	{###}	{###}	{###}
		150	329	680	958	>1000	>1000
9		{}	{}	{}	{o}	{00}	{00}
		82	85	113	268	479	520
10	NaCl	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}	{###}

		912	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
11		{}	{}	{}	{o}	{o}	{00}/
		110	120	126	189	302	507
12		{}	{}	{}	{}	{}	{}
		85	87	81	92	102	83
13	NaBr	{}	{}	{}	{}	{}	{}
		110	116	114	95	104	112
14		{}	{}	{}	{}	{}	{}
		95	110	125	85	93	85
15		{}	{}	{}	{}	{}	{}
		88	100	79	87	106	102
16		NaNO <sub>3</sub>	{}	{}	{}	{}	{}
	75		85	103	102	88	86
17	{}		{}	{}	{}	{}	{}
		68	65	73	69	100	79
18		{}	{}	{}	{}	{}	{}
		88	59	100	67	95	86
19		NaJ	{}	{}	{}	{}	{}
	78		93	112	85	96	79
20	{}		{}	{}	{}	{}	{}
		112	105	126	102	98	115
21		{}	{}	{}	{}	{}	{}
		109	96	75	112	87	83

Los resultados se tabulan como {evaluación visual} y "valor numérico" (a.u., medición de dispersión del lado de los 90°)

5 Ejemplo 7

Estabilidad de las soluciones que contienen termolisina en presencia de diferentes sales

10 Se disolvió el liofilizado THERMOASE a las concentraciones de 100, 50, y 25 mg/ml en 20 mM de HEPES, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH de 7,5. Inmediatamente a continuación, se añadió y se disolvió una sal seleccionada a partir del grupo que incluye KCl, NaCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, y CaCl<sub>2</sub>. No se añadió ninguna sal como control. La tabla 15 indica las concentraciones de los iones respectivos en las soluciones, teniendo en cuenta las cantidades presentes en el liofilizado. Debe observarse que los iones presentes en el tampón HEPES no se tienen en cuenta en la tabla.

15 Tabla 15

Soluciones de termolisina con diferentes sales añadidas								
Nº	Sal añadida	Concentración del liofilizado en [mg/ml]	Termolisina en bruto en [mg/ml]	Termolisina en [mg/ml]	Na <sup>+</sup> ~ [M]	Cl <sup>-</sup> ~ [M]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ~ [M]	K <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , Mg <sup>++</sup> , Ca <sup>++</sup> [M]
22	-	100	33	23	1,125	1,122	0,006	0
23		50	16,5	11,5	0,562	0,566	0,003	0
24		25	8,3	5,8	0,281	0,288	0,002	0
25	KCl	100	33	23	1,125	3,122	0,006	2,0
26		50	16,5	11,5	0,562	2,566	0,003	2,0
27		25	8,3	5,8	0,281	2,288	0,002	2,0
28	NaCl	100	33	23	3,125	3,122	0,006	2,0
29		50	16,5	11,5	2,562	2,566	0,003	2,0
30		25	8,3	5,8	2,281	2,288	0,002	2,0
31	LiCl	100	33	23	1,125	3,122	0,006	2,0
32		50	16,5	11,5	0,562	2,566	0,003	2,0
33		25	8,3	5,8	0,281	2,288	0,002	2,0
34	MgCl <sub>2</sub>	100	33	23	1,125	5,122	0,006	2,0
35		50	16,5	11,5	0,562	4,566	0,003	2,0
36		25	8,3	5,8	0,281	4,288	0,002	2,0
37	CaCl <sub>2</sub>	100	33	23	1,125	5,122	0,006	2,0
38		50	16,5	11,5	0,562	4,566	0,003	2,0
39		25	8,3	5,8	0,281	4,288	0,002	2,0

La tabla 16 indica, con respecto a las mezclas proporcionadas en la tabla 15, si se obtuvo una solución homogénea estable (es decir, clara, no turbia) y durante cuánto tiempo permaneció así. Se evaluó la turbidez mediante la

inspección visual y las mediciones que se describen en el ejemplo 9. Los símbolos que se presentan en la tabla indican lo siguiente:

5	{###} opaca {00} turbia {o} levemente turbia {} clara	Evaluación mediante inspección visual	a.u., medición de la dispersión en el lado de los 90° 901 - >1000 (desbordamiento) 401 - 900 131 - 400 0 - 130
---	--	---------------------------------------	--

10

Tabla 16

Estabilidad de las soluciones de termolisina en presencia de diferentes sales							
Nº	Sal añadida	[0,1 h.]	[1 h.]	[5 h.]	[10 h.]	[15 h.]	[20 h.]
22	-	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000
23		{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000
24		{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000
25	KCl	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000
26		{o} 250	{o} 394	{00} 599	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000
27		{} 82	{} 95	{} 119	{o} 269	{00} 708	{###} 988
28	NaCl	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000	{###} >1000
29		{} 85	{} 115	{} 129	{o} 189	{o} 350	{00} 487
30		{} 98	{} 102	{} 115	{} 78	{} 95	{} 105
31	LiCl	{} 78	{} 85	{} 76	{} 115	{} 104	{} 126
32		{} 69	{} 78	{} 103	{} 78	{} 75	{} 86
33		{} 88	{} 96	{} 84	{} 109	{} 83	{} 87
34	MgCl <sub>2</sub>	{} 102	{} 85	{} 78	{} 96	{} 109	{} 76
35		{} 96	{} 86	{} 87	{} 79	{} 115	{} 78
36		{} 84	{} 76	{} 95	{} 88	{} 94	{} 117
37	CaCl <sub>2</sub>	{} 102	{} 115	{} 123	{} 100	{} 99	{} 114
38		{} 85	{} 78	{} 95	{} 86	{} 112	{} 79
39		{} 78	{} 79	{} 72	{} 85	{ 110 0	{ 95

Los resultados se tabulan como {evaluación visual} y "valor numérico" (a.u., medición de dispersión del lado de los 90°)

15 Ejemplo 8

Determinación de la turbidez

20 Para la presente invención, se llevaron a cabo observaciones basadas en instrumentos de la turbidez con un instrumento CARY ECLIPSE (Varian, Inc. Palo Alto, CA, EE.UU.).

25 Se proporcionaron dos muestras líquidas, la primera de las cuales era un tampón acuoso homogéneo con 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 170 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, pH de 7,5 como ingredientes disueltos; la segunda muestra era un coloide que incluía el mismo tampón y también aproximadamente 5 mg/ml de termolisina (véanse también los ejemplos 2 y 3). Antes de que se tomaran las mediciones, se dejó que el coloide se formara durante la noche a 10°C. La configuración de los parámetros del instrumento fue la siguiente:

	Instrumento:	Cary Eclipse
	Número de serie del instrumento	EL06033429
	Modo de datos:	Fluorescencia
5	Modo de escaneo	Emisión
	Modo X	Longitud de onda (nm)
	Inicio (nm)	200
	Final (nm)	1000
	Longitud de onda de excitación (nm)	800
10	Hendidura de excitación (nm)	5
	Hendidura de emisión (nm)	5
	Tasa de escaneo (nm/min.)	600
	Intervalo de datos (nm)	1
	Tiempo medio (s.)	0,1
15	Filtro de excitación	Auto
	Filtro de emisión	Abierto
	Voltaje PMT (V)	Medio
	Espectro corregido	Apagado
	Soporte multicelular	Multicelular
20	Multicero	Apagado

Se analizaron muestras líquidas en cubetas de cuarzo estándar. Ambas muestras se caracterizaron mediante el escaneo de la longitud de onda, en el que la longitud de onda de la luz entrante aumentó de 200 nm a 1.000 nm. La longitud de onda de detección se mantuvo constante a 800 nm. No se detectó fluorescencia u opalescencia. Se detectó la luz dispersada con la longitud de onda de la luz entrante. Los resultados se describen en la figura 1 (A) y (B). Para la muestra de tampón claro la intensidad de la luz dispersada medida fue de aproximadamente 100 unidades arbitrarias (a.u.). Para el coloide de la segunda muestra, la luz dispersada creó un desbordamiento en el detector.

Ejemplo 9

Inspección visual y mediciones de turbidez

Para la demostración de los efectos de la presente invención, se realizaron observaciones basadas en instrumentos de la turbidez con un instrumento CARY ECLIPSE (Varian, Inc. Palo Alto, CA, EE.UU.). La longitud de onda de la luz entrante fue de 800 nm; se midió la dispersión del lado de los 90° a la misma longitud de onda (es decir, 800 nm). La configuración de los parámetros del instrumento fue la siguiente:

	Instrumento:	Cary Eclipse
	Número de serie del instrumento	EL06033429
40	Modo de datos:	Fluorescencia
	Longitud de onda de emisión (nm)	800
	Longitud de onda de excitación (nm)	800
	Hendidura de excitación (nm)	5
45	Hendidura de emisión (nm)	5
	Tiempo medio (s.)	0,1
	Filtro de excitación	Auto
	Filtro de emisión	Abierto
	Voltaje PMT (V)	Medio
50	Soporte multicelular	Multicelular
	Multicero	Apagado
	Réplicas	1
	Promediación de las muestras	Apagado

Se analizaron muestras líquidas en cubetas de cuarzo estándar.

Se llevó a cabo la inspección visual de muestras líquidas que contenían termolisina en los tubos de ensayo mediante la agrupación de las muestras en cuatro categorías: (i) "clara", (ii) "levemente turbia", (iii) turbia, (iv) "opaca". Por consiguiente, las categorías (ii)-(iv) reflejaron grados mayores de turbidez. Las categorías se correlacionaron con la lectura de las unidades arbitrarias (a.u.), tal y como se indica en la tabla 17.

Tabla 17

Turbidez de las muestras líquidas, categorías		
Categoría	Valores ejemplares medidos	Rango de valores por categoría
Clara	114; 85; 95	0 – 130
Levemente turbia	182; 188; 236; 248; 304; 297	131 – 400
Turbia	760; 783; 810; 815; 847	401 – 900

Opaca	-1000; >1000	901 - >1000 (=rebosamiento)
-------	--------------	-----------------------------

Para los fines de la presente invención, una solución "clara" que contiene termolisina se caracteriza por una turbidez (determinada como se describe con anterioridad) aproximadamente equivalente a (es decir aproximadamente igual a) la turbidez de una solución sin termolisina pero con la misma composición y concentraciones del resto de los ingredientes respectivos. De acuerdo con la invención y tal y como se muestra con anterioridad, esto se corresponde al rango de entre 0 a.u. y 130 a.u., más preferible al rango de entre 50 a.u. y 130 a.u., determinado como difusión del lado de los 90° mediante la utilización de una luz con una longitud de onda de 800 nm bajo las condiciones descritas con anterioridad.

10 Ejemplo 10

Detección espectrofotométrica de proteínas en el preparado de THERMOASE

15 Todos los procedimientos previos a la fotometría se llevaron a cabo a temperatura helada. La THERMOASE se proporcionó en forma de polvo amorfo liofilizado (Daiwa Kasei K.K.). Se disolvió una cantidad del liofilizado THERMOASE en tampón acuoso Tris, que contenía 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 40 mM de TrisHCl, pH de 7,5, para producir una solución del liofilizado THERMOASE con una concentración de 1 mg/ml.

20 Tan pronto como se consiguió una solución clara (evaluada mediante inspección visual), se realizaron lecturas fotométricas a 277 nm y a 25°C.

25 Se analizaron repetidamente tres lotes diferentes de THERMOASE. Las lecturas fotométricas se encontraron en el rango de entre 0,57 y 0,61. Se asumió que el impacto potencial de las diferencias entre los valores de A (1 mg/ml) determinados a 277 nm y a 280 nm fue insignificante y menor a otras fuentes de errores potenciales.

Tabla 18

Porcentaje [peso/peso] de proteínas (termolisina en bruto) en los preparados de THERMOASE mediante la utilización de diferentes valores de A (1 mg/ml) como referencia			
			A (1 mg/ml)
Lote de THERMOASE	extinción a 277 nm (rango)	1,765	1,83
1	0,60 - 0,61	34% - 35%	33%
2	0,57 - 0,59	32% - 33%	31% - 32%
3	0,58 - 0,60	33% - 34%	32% - 33%

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar una solución de termolisina (EC 3.4.24.27) en la que la termolisina disuelta se presenta en forma estabilizada, y el método incluye el primer paso (P) de mezclar una preparación sólida que incluye termolisina con un disolvente acuoso y elaborar una primera solución, en la que el preparado sólido incluye termolisina a una concentración de aproximadamente el 20% [peso/peso] o mayor, y en el que la primera solución incluye
- 10 (i) una sal tampón capaz de mantener un pH en el rango de entre 4,5 y 9,  
(ii) una o más sales, y  
(iii) termolisina,
- 15 y en la primera solución la concentración del preparado que incluye termolisina en el disolvente acuoso se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la concentración total de una o más sales, que incluyen la(s) sal(es) tampón, se encuentra en el rango de entre aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método también incluye el subsiguiente paso (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas, y disolver la sal adicional, y en el que la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida tras el paso (Q) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1,5 M y
- 20 aproximadamente 5 M,  
preparando así una segunda solución en la que la termolisina disuelta se presenta en forma estabilizada.
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en el paso (P) el preparado sólido que incluye termolisina también incluye una o más sales.
- 30 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que en el paso (P) el preparado sólido incluye termolisina a una concentración en el rango de entre aproximadamente el 20% [peso/peso] y 100% [peso/peso].
- 35 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que en el paso (P) la concentración del preparado que incluye termolisina en el disolvente acuoso se encuentra en el rango de entre aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 60 mg/ml.
- 40 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que en el subsiguiente paso (Q) la sal adicional se añade en forma sólida.
- 45 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la concentración de iones sulfato en la primera solución obtenida en el paso (P) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM.
- 50 7. El método de acuerdo con reivindicación 6, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 3,5 M.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) la concentración de termolisina es de aproximadamente 5 mg/ml o mayor, y menor de aproximadamente 35 mg/ml.
9. El método de acuerdo con reivindicación 8, en el que en la segunda solución obtenida tras el paso (Q) la concentración de termolisina es de aproximadamente 10 mg/ml o mayor, y menor de aproximadamente 35 mg/ml, y la sal adicional en el paso (Q) se selecciona a partir del grupo que incluye NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>.

**Fig. 1**

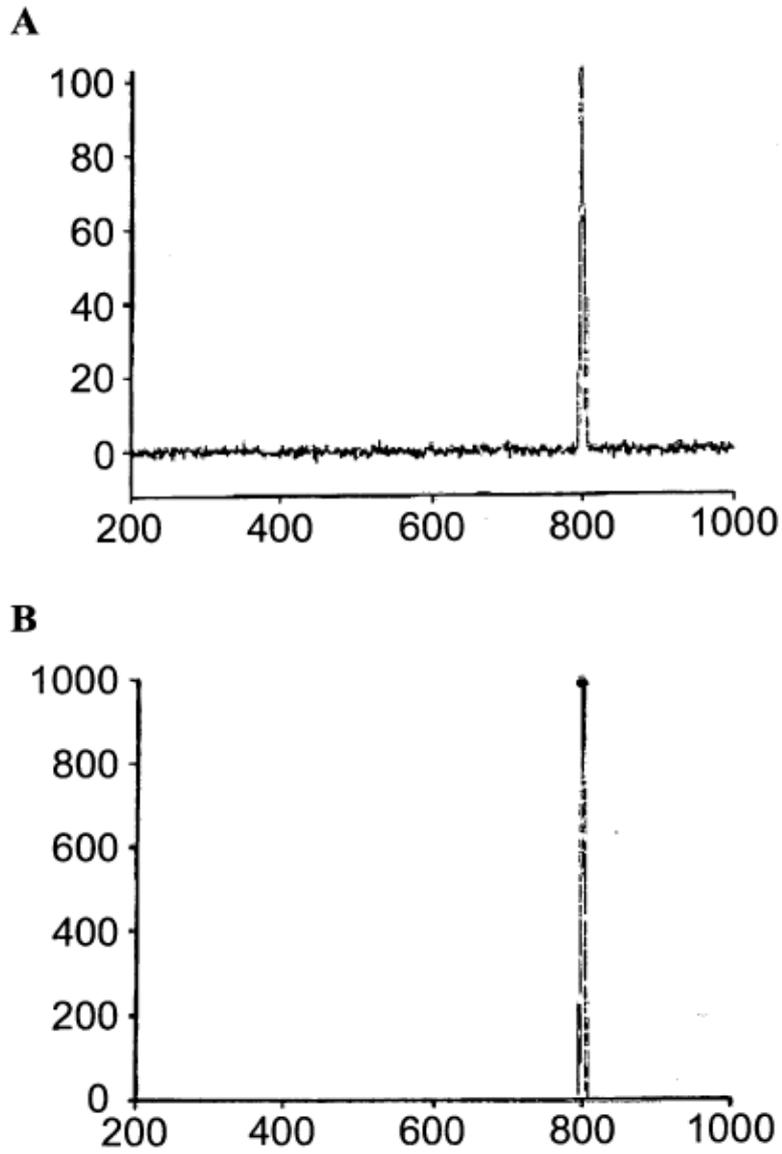
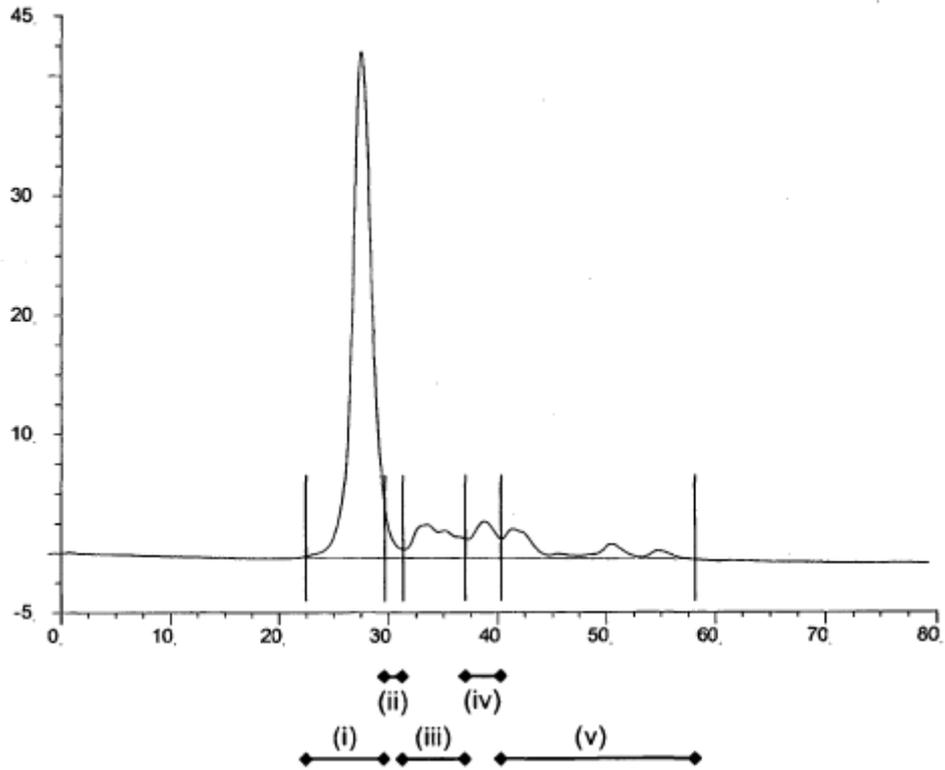


Fig. 2



**Fig. 3**

