

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 618**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2010 E 10718616 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2432874**

54 Título: **Hialuronidasa extracelular de Streptomyces koganeiensis**

30 Prioridad:

14.05.2009 IT MI20090831

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

27.01.2015

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**MESSINA, LUCIANO;
VACCARO, SUSANNA;
CARUSO, SALVATORE y
GENNARI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 618 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

Hialuronidasa extracelular de *Streptomyces koganeiensis*

Estado de la técnica

5 La hialuronidasa es una enzima hidrolítica que escinde ácido hialurónico hasta ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina; de manera variable, también es capaz de degradar otros mucopolisacáridos ácidos del tejido conectivo. Por ejemplo, se hallan concentraciones elevadas de hialuronidasa en el aparato bucal de sanguijuelas, en los venenos de serpientes, abejas, escorpiones y en los sobrenadantes de cultivos de bacterias patógenas tales como neumococos, estreptococos β -hemolíticos y *Staphylococcus aureus*. En el cuerpo humano, la hialuronidasa se halla en la córnea, el cuerpo ciliar, bazo, piel y testículos. También se hallan cantidades elevadas de hialuronidasa en los espermatozoides, lo que les permite atravesar la barrera de ácido hialurónico que protege a los óvulos.

10 La hialuronidasa se usa en medicina en el tratamiento del edema, los estados inflamatorios locales, las hemorroides y los sabañones, y para facilitar la administración subcutánea de algunos ingredientes activos. También se informó de que algunas hialuronidasas son capaces de producir una reducción significativa del tamaño del infarto de miocardio [1]. En el campo veterinario, se usa en disoluciones de antibióticos para el tratamiento de enfermedades animales, tales como la mastitis bovina. Además, la hialuronidasa se puede usar como reactivo analítico en algunos ensayos biológicos, por ejemplo en la determinación cuali-cuantitativa de ácido hialurónico.

15 La producción y purificación a escala industrial de hialuronidasas bacterianas o animales es difícil debido al hecho de que la enzima se hace inestable en disolución acuosa y pierde actividad tras la purificación.

20 El documento US 4.258.134 y la patente europea correspondiente EP 0 005 751 [2] describen una hialuronidasa obtenida mediante diálisis y cromatografía de intercambio iónico con DEAE- y CM-celulosa del sobrenadante de cultivo de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31399.

Ahora se ha descubierto que tal fracción de proteínas, obtenida tras las dos etapas de cromatografía, está constituida de hecho por numerosos componentes proteicos (alrededor de 68 en una electroforesis bidimensional), pero solamente uno de ellos tiene una actividad de hialuronidasa elevada y una estabilidad notable.

25 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a la hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31399 que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal mostrada en SEQ ID N° 1, y que tiene un peso molecular de 21,6 kDa, un punto isoelectrónico (pI) que oscila entre 4,4-4,8 y una actividad enzimática igual o mayor que 40.000 U.I./mg.

La hialuronidasa según la invención se puede obtener mediante un proceso que incluye las etapas siguientes:

30 a) someter al sobrenadante obtenido de la fermentación de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 a cromatografía de intercambio catiónico débil y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa;

b) someter a la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa obtenida en la etapa a) a diafiltración y cromatografía de intercambio aniónico fuerte y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa;

35 c) someter a la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa obtenida en la etapa b) a cromatografía de intercambio catiónico fuerte y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa;

d) someter a la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa obtenida en la etapa c) a cromatografía de intercambio aniónico fuerte y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa.

40 La fermentación del microorganismo se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos, en particular el método descrito en el documento US 4.258.134. El sobrenadante obtenido tras la fermentación se recoge, se centrifuga y se filtra. Además, antes de someterlo a las etapas de cromatografía según la invención, el sobrenadante se puede someter a tratamientos adicionales dirigidos a eliminar las partículas residuales del cultivo, mediante métodos y técnicas conocidas para la persona experta. Normalmente, el sobrenadante centrifugado y filtrado se somete a concentración y diálisis. En general, la concentración se lleva a cabo mediante ultrafiltración en filtros adecuados de polietersulfona con umbrales que oscilan entre 5 y 15 kDa, preferiblemente de 10 kDa; normalmente, el sobrenadante se concentra de 8 a 12 veces, preferiblemente 10 veces. Una vez que se verifica la presencia de la actividad de hialuronidasa mediante un ensayo adecuado, por ejemplo el ensayo modificado de Dorfman [3], el sobrenadante concentrado se dializa con una disolución tampón que se elige dependiendo de la resina de intercambio catiónico débil usada en la etapa a), de tal manera que la hialuronidasa está en tales condiciones de pH que puede unirse a la resina; esta resina comprende grupos de intercambio de carboxialquilo, preferiblemente grupos carboximetilo, tal como la resina "CM-Sepharose® Fast Flow". Después de equilibrar de manera adecuada la resina con la misma disolución tampón en la que se llevó a cabo la diálisis, se carga la muestra y después se lleva a cabo la elución con la misma disolución para eliminar las proteínas sin unir, tras lo cual se incrementa el pH para eluir las proteínas unidas. Cuando se usa la resina "CM-Sepharose® Fast Flow", se lleva a cabo la diálisis, el equilibrado de la resina y la elución de las proteínas sin unir con una disolución de acetato sódico 50 mM a pH 4,0,

mientras la elución de las proteínas unidas se lleva a cabo con una disolución de acetato sódico 50 mM a pH 4,5. Las proteínas unidas que exhiben una actividad elevada de hialuronidasa se mezclan en una única fracción y se someten a cromatografía de intercambio aniónico fuerte [etapa b)]. Antes de continuar, las fracciones mezcladas se aclaran mediante diafiltración, que se lleva a cabo mediante medios y métodos conocidos para la persona experta, con el uso de una disolución tampón que permite que la hialuronidasa se una a la resina de intercambio aniónico fuerte usada en la etapa b). Tal resina comprende grupos trialkilamonio, en general grupos trimetilamonio, tal como la resina HiTrap[®] Q XL (columna de 5 ml). Después de equilibrar la resina con la misma disolución usada para la diafiltración, la fracción obtenida en la etapa a) se carga y después se lleva a cabo la elución con la misma disolución para eliminar las proteínas sin unir; después, la fuerza iónica del eluyente se incrementa progresivamente para eluir las proteínas unidas. Según una realización preferida, se usa la resina HiTrap[®] Q XL y la diafiltración, el equilibrado de la columna y la elución de las proteínas sin unir se llevan a cabo con una disolución tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8, mientras la elución de las proteínas unidas se lleva a cabo añadiendo NaCl a concentraciones crecientes al eluyente. Al eluir primero con Tris-HCl 50 mM, disolución de NaCl 35 mM a pH 8 y después Tris-HCl 50 mM, disolución de NaCl 200 mM a pH 8, se obtienen dos fracciones, y solamente la segunda, eluida con la disolución que contiene NaCl 200 mM, exhibe actividad de hialuronidasa. Tal fracción se diluye 8 - 12 veces, preferiblemente 10 veces, con una disolución tampón que permite que la hialuronidasa se una a la resina de intercambio catiónico fuerte usada para la etapa c). La resina comprende grupos sulfónicos, preferiblemente grupos sulfonil alquilo, aún más preferiblemente grupos sulfonil propilo; según una realización especialmente preferida de la invención, se usa la resina "HiTrap[®] SP FF". En la práctica, después del equilibrado de la resina con la misma disolución tampón en la que se diluyó la fracción de hialuronidasa obtenida en la etapa b) y de la carga de la muestra, se lleva a cabo el lavado con la misma disolución tampón (alrededor de 20 volúmenes de lecho), tras lo cual se lleva a cabo la elución de las proteínas unidas, incrementando progresivamente el pH del eluyente. En general, para la resina HiTrap[®] SP FF, la dilución, el equilibrado de la columna y el lavado se llevan a cabo con una disolución tampón de fosfato sódico 20 mM a pH 4, mientras la elución se lleva a cabo con tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 4,8; las fracciones con actividad elevada de hialuronidasa se mezclan en una única fracción, que se somete a cromatografía de intercambio aniónico fuerte [etapa d)]. Normalmente, antes de la cromatografía, tal fracción se diluye 8 - 12 veces, preferiblemente 10 veces, en un tampón de equilibrado adecuado, que permite que la hialuronidasa se una a la resina elegida. La resina para la etapa d) es una resina de intercambio aniónico fuerte que comprende grupos amonio cuaternarios; preferiblemente, se usa una columna Resource Q[®]. Después de cargar la muestra, se lleva a cabo el lavado con el mismo tampón de equilibrado y después se lleva a cabo la elución de las proteínas unidas disminuyendo progresivamente el pH en 0,5 unidades, hasta pH 4. Cuando se usa una columna Resource Q[®], la dilución de la fracción de hialuronidasa, el equilibrado de la columna y el lavado tras la carga de la muestra se llevan a cabo con acetato sódico 20 mM a pH 5,5; disminuyendo progresivamente el pH como se definió anteriormente, se obtiene una primera fracción de proteínas a pH 5 y dos fracciones de proteínas a pH 4; la segunda fracción eluida a pH 4 tiene una absorbancia a 280 nm y una actividad enzimática mayor que las otras dos fracciones, como muestra la Figura 2. Al someter a tal fracción a cromatografía SDS-PAGE del 12% y tinción de plata (Figura 6), se observa una única banda de proteína con un peso molecular aparente de alrededor de 25 kDa. En particular, el 99% de la hialuronidasa purificada mediante el proceso anteriormente descrito tiene un peso molecular aparente de alrededor de 25 kDa. Tal proteína comprende solamente alrededor de un 5% de la hialuronidasa presente en el sobrenadante obtenido tras la fermentación; por lo tanto, el proceso permite obtener un enriquecimiento de alrededor de 20 veces con un rendimiento de alrededor del 30%.

Con respecto a otras hialuronidasas conocidas hasta la fecha, la de la invención es sumamente estable en disolución acuosa, no es sensible a la acción de las enzimas proteolíticas y tiene una pureza en HPLC mayor que el 98% (Figs. 5a-5h), que es necesaria para el uso terapéutico; por lo tanto, se puede usar, sola o en combinación con otros ingredientes activos, en la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias para el tratamiento de enfermedades en las que es necesario o ventajoso degradar el ácido hialurónico presente en el órgano o tejido afectado por la enfermedad.

Gracias a la estabilidad elevada en disolución acuosa, la hialuronidasa de la invención se puede formular también en forma de composiciones basadas en disolución acuosa, tales como disoluciones, cremas hidrófilas, hidrogeles, además de la forma de productos lipófilos tales como pomadas o cremas oleosas.

Con respecto al uso en seres humanos, la hialuronidasa de la invención se puede usar para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento del edema, en particular el edema traumático, o estados inflamatorios, tales como el síndrome hemorroidal; además, se puede usar para la preparación de composiciones para el tratamiento de sabañones. La hialuronidasa de la invención se puede usar también en combinación con otros fármacos cuyo incremento de biodisponibilidad es necesario o ventajoso.

Por ejemplo, para el tratamiento del edema traumático, son especialmente ventajosas las combinaciones de la hialuronidasa según la invención con agentes anticoagulantes y/o fibrinolíticos. Tales combinaciones también pueden contener opcionalmente uno o más agentes anti-inflamatorios esteroideos o no esteroideos. Además, el ácido hialurónico sulfatado, que también se sabe que tiene propiedades antitrombóticas y anticoagulantes, además de propiedades anti-inflamatorias, se puede combinar de manera ventajosa con estas composiciones. Un ejemplo de ácido hialurónico sulfatado que se puede usar para ese propósito se describe, por ejemplo, en el documento EP 0702699.

Las combinaciones de la hialuronidasa según la invención con otros ingredientes activos también son ventajosas en el caso de las preparaciones inyectables que contienen ingredientes activos de pesos moleculares especialmente elevados, por ejemplo anticuerpos monoclonales, citocinas o enzimas, que se administran normalmente de manera intravenosa; la hialuronidasa permite administrarlos de manera subcutánea, según el procedimiento denominado EASI (infusión subcutánea aumentada enzimáticamente), que se emplea principalmente para la sustitución de fluidos en pacientes terminales, de tal manera que se limitan o se evitan los cuidados de enfermería. La hialuronidasa según la invención se puede emplear también para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores sólidos resistentes; de hecho, mediante la degradación del ácido hialurónico, se reduce la presión del líquido intersticial en la masa tumoral, lo que retrasa o inhibe su crecimiento. Por la misma razón, también se incrementa la eficacia de los ingredientes activos antitumorales combinados opcionalmente con ella. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen hialuronidasa en combinación con uno o más ingredientes activos antitumorales, tales como alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina) y taxanos (paclitaxel).

Un uso terapéutico adicional de la hialuronidasa según la invención se refiere al tratamiento de formas alérgicas mediadas por IgE a través de la desensibilización potenciada por enzimas (EPD = *desensibilización potenciada por enzimas*), que consiste en administrar dosis extremadamente bajas de alérgenos para desensibilizar a los sujetos susceptibles a ellos. Mediante la asociación de la hialuronidasa con un alérgeno, es posible incrementar la eficacia del tratamiento, ya que el alérgeno alcanza más fácilmente el sitio de acción. Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención consiste en composiciones farmacéuticas que contienen hialuronidasa junto con uno o más alérgenos que inducen reacciones alérgicas mediadas por IgE. La hialuronidasa también tiene uso como factor de difusión de fármacos para uso odontológico en el tratamiento de enfermedades de la cavidad bucal, por ejemplo anestésicos locales y antibióticos; por lo tanto, según un aspecto adicional, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen la hialuronidasa según la invención junto con uno o más anestésicos locales o antibióticos.

En oftalmología, la hialuronidasa permite acelerar notablemente el tratamiento de las hemorragias vítreas espontáneas y se puede usar, sola o en combinación con otros ingredientes activos, en la preparación de formas farmacéuticas para uso oftálmico, tales como disoluciones, suspensiones, geles, cremas y pomadas, para el tratamiento de dichas hemorragias.

Con respecto al uso veterinario, una enfermedad que se puede tratar de manera eficaz con la hialuronidasa de la invención es la mastitis bovina; en ese caso, la hialuronidasa se puede administrar en combinación con antibióticos, tales como penicilina G, cefalosporinas de I-IV generación y aminopenicilinas potenciadas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante técnicas y excipientes conocidos para la persona experta, por ejemplo según lo que se describe en Remington, "The Science and the Practice of Pharmacy", 21ª ed. (Lippincott, Williams & Wilkins); tales composiciones incluyen, en particular, preparaciones inyectables y preparaciones tópicas para aplicación dérmica, transdérmica y oftálmica. En particular, las preparaciones tópicas para aplicación epidérmica se pueden seleccionar de cremas, geles, pomadas y soluciones de aerosoles, aunque las preparaciones tópicas para aplicación oftálmica se pueden seleccionar de cremas, geles, pomadas, soluciones y suspensiones. Como se indicó previamente, gracias a su estabilidad en disolución acuosa, la hialuronidasa según la invención se puede formular en productos basados en disolución acuosa; un técnico experto puede hacer la elección entre una formulación basada en disolución acuosa y oleosa basándose en el conocimiento habitual en el campo de la tecnología farmacéutica, dependiendo de los otros componentes presentes en la composición.

Finalmente, la hialuronidasa según la invención se puede usar como reactivo en ensayos bioquímicos para la determinación cuali-cuantitativa de ácido hialurónico.

Descripción de las figuras

FIG. 1: electroforesis bidimensional de la fracción de CM-celulosa positiva para la actividad de hialuronidasa que procede del sobrenadante de cultivo de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394.

FIG. 2: cromatograma de hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* obtenida tras cromatografía en columna Resource Q® (etapa d).

FIG. 3: patrón de proteínas en SDS-PAGE del 12% de las fracciones obtenidas al final de cada etapa de purificación según la invención comparado con el patrón de proteínas del sobrenadante.

FIG. 4: análisis de la pureza de hialuronidasa mediante HPLC en una columna de filtración en gel Bio-Sil SEC [etapa d)].

FIGs. 5a-4h: análisis mediante SDS-PAGE y espectros de absorción de la secuenciación N-terminal de la hialuronidasa obtenida en la etapa d).

FIG. 6: análisis mediante SDS-PAGE no desnaturalizante para la determinación de la actividad de hialuronidasa; comparación entre la hialuronidasa obtenida en la etapa d) y la hialuronidasa obtenida según el documento US 4.258.134.

FIG. 7: determinación mediante espectrometría de masas del peso molecular de la hialuronidasa obtenida en la etapa d).

FIG. 8: determinación del punto isoeléctrico de la hialuronidasa obtenida en la etapa d).

5 FIG. 9: comparación entre las actividades enzimáticas de ciertas hialuronidasas disponibles comercialmente y la hialuronidasa según la invención.

Parte experimental

La invención se describirá a continuación con más detalle en la siguiente parte experimental, que ilustra el mejor modo de llevar a cabo la invención, que no se debe considerar en un sentido limitante.

Materiales y métodos

10 Cultivo del microorganismo

Se obtuvo *S. koganeiensis* de la American Type Culture Collection (ATCC 31394) y se cultivó como se describió en [2]. Brevemente, el microorganismo se cultivó en 1 litro de medio de cultivo [(20 g/l de extracto de levadura (Organotechnie) y 5 g/l de peptona de soja (Solabia), pH 6,9)] a 30 °C, con agitación a 150 rpm y durante alrededor de 16 h. Tras el cultivo, se usó el cultivo para inocular un fermentador de 50 litros (Biostat U, B.BRAUN) que contenía 30 litros del medio adecuado [(10 g/l de extracto de levadura (Organotechnie), 5 g/l de peptona de soja (Solabia), 3 g/l de extracto de malta (Costantino), 3 g/l de dextrina de tipo I (Sigma), 0,2 g/l de antiespumante (Sigma)]. Antes de la inoculación, el pH se llevó a 7,0 con NaOH; durante la fermentación se monitorizó el pH, pero no se controló, y la temperatura se mantuvo a 30 °C a lo largo de la fermentación, mientras la agitación se mantuvo a 300 rpm, con aireación de 1,6 VVM (volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto). La fermentación duró 48 h, tiempo que correspondió a la producción más alta de actividad de enzima hialuronidasa (1×10^5 - $1,3 \times 10^5$ U.I./l) en el sobrenadante de cultivo.

Al final de la fermentación, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min a 4 °C (SORVALL Evolution RC) y se filtró con filtros de flujo tangencial de polietersulfona de 0,2 µm, de tal manera que se eliminó la biomasa de *Streptomyces koganeiensis* (que se dio en forma de agregados redondeados con hifas de 1-4 mm de diámetro) y se obtuvo un sobrenadante clarificado que contenía hialuronidasa.

25 Determinación de la actividad de hialuronidasa

La actividad de hialuronidasa se midió mediante el método modificado de Dorfman [3]. Brevemente, el producto obtenido de las cromatografías de DEAE- y CM-celulosa se diluyó en tampón fosfato 0,03 M, 0,82% de NaCl, pH 6,3, y 1 ml de la disolución así obtenida se mezcló con 1 ml de tampón de sustrato (tampón fosfato 0,03 M, 0,82% de NaCl, pH 6,3) que contenía 0,5 mg de ácido hialurónico. La digestión enzimática se llevó a cabo a 37 °C durante 30 min, y al final del proceso de incubación se generó turbidez añadiendo 4 ml de solución ácida basada en suero de caballo (SIGMA). Se midió la densidad óptica a 640 nm exactamente 30 min después de añadir la disolución ácida basada en suero de caballo. Se usó un patrón de hialuronidasa de testículo de mamífero (EDQM, Hialuronidasa FIP, H1115000) que contenía 328 U.I./mg para construir una curva patrón, y se calculó la actividad de la muestra (en unidades) mediante el uso de esta curva.

Cromatografías

Las resinas y columnas de cromatografía se adquirieron de GE Healthcare Life Sciences y se almacenaron según las especificaciones proporcionadas por el proveedor. Las etapas de equilibrado y elución se llevaron a cabo con un sistema de cromatografía líquida de rendimiento rápido (FPLC; AKTA explorer 100, GE Healthcare) a un caudal de 40-50 ml/min para la primera cromatografía y 5 ml/min para las cromatografías siguientes. Al final de cada etapa de cromatografía, se verificó la actividad de hialuronidasa con el ensayo modificado de Dorfman descrito en la etapa previa.

Para el análisis de la pureza mediante filtración en gel, se usó el instrumento LC-10AD HPLC (SHIMADZU) con una columna Bio-Sil SEC (BIO-RAD), eluyendo con NaH_2PO_4 0,05 M, Na_2HPO_4 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 6,6, a 1 ml/min. La longitud de onda de la absorción usada fue 214 nm (SPD-10A, SHIMADZU). La pureza de la proteína se determinó mediante el uso del programa informático LC solution 1.21 SP1.

Electroforesis de SDS-PAGE

Los análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se llevaron a cabo mediante el uso del método de Laemmli [4] en un gel de poliacrilamida del 12%, mediante el uso de un Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) según las instrucciones del proveedor. El peso molecular de la proteína purificada se estimó mediante la comparación con proteínas patrón de pesos moleculares bajos (BIO-RAD).

Electroforesis bidimensional e isoelectroenfoque

La fracción de proteínas a analizar se mezcló en un tampón de carga adecuado y se cargó en tiras IPG de pH 3-10 (ReadyStrips de 7 cm, BIO-RAD); la tira se incubó a 25 °C hasta la absorción de muestra y se cargó en la celda PROTEAN IEF (BIO-RAD) para el isoelectroenfoque (IEF).

- 5 Al final del isoelectroenfoque (primera dimensión), la tira se equilibró con un tampón adecuado de carga y electroforesis, después se cargó en la segunda dimensión en SDS-PAGE del 12%, mediante el uso de celdas Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD).

Análisis densitométricos

- 10 Los geles de poliacrilamida, teñidos de manera adecuada con Tinción de Plata Plus (BIO-RAD) o Coomassie (BIO-RAD), se analizaron con un aparato de laboratorio de obtención de imágenes ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), mientras los análisis (cuantitativos y cualitativos) se llevaron a cabo empleando el programa informático de análisis de imágenes ImageQuant TL (GE Healthcare). Los análisis de imágenes en geles de poliacrilamida SDS-PAGE bidimensionales se llevaron a cabo empleando el programa informático ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

Espectrometría de masas

- 15 Los análisis de espectrometría de masas para la determinación del peso molecular se llevaron a cabo mediante el uso del espectrómetro de masas Ultraflex III TOF/TOF (BRUKER) y marcadores Bruker Protein Mix 1, mientras la identificación de proteínas se llevó a cabo mediante el uso de los valores de masas exactos de péptidos determinados mediante un sistema MALDI-MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems).

Secuenciación del extremo N-terminal

- 20 La secuenciación de aminoácidos N-terminal se llevó a cabo según el método de degradación de Edman mediante el uso de un secuenciador de proteínas automatizado en fase líquida pulsátil (ABI-Perkin Elmer, Mod. 477A). Se usó el programa informático BLAST [5] para llevar a cabo búsquedas de homología en el banco de datos de GenBank, y en el del proyecto del genoma del género *Streptomyces* disponible en Internet.

Comparación entre las actividades enzimáticas de diferentes tipos de hialuronidasas

- 25 El potencial enzimático de la hialuronidasa según la invención se estudió mediante la comparación con las actividades enzimáticas de algunas de las hialuronidasas disponibles comercialmente más usadas (patrón de hialuronidasa FIP, hialuronidasa de testículo bovino de tipo I-S (SIGMA), hialuronidasa de testículo bovino de tipo VI-S (SIGMA), hialuronidasa de testículo de oveja de tipo V (SIGMA), hialuronidasa de *Streptomyces hyalurolyticus* (SIGMA)), mediante el uso del ensayo enzimático descrito anteriormente, y el valor de la actividad se representó en la Figura 9 como U.I./mg (la concentración de proteína se determinó mediante el equipo de reactivos de ensayo de proteínas BCA, PIERCE).
- 30

Ejemplo 1 (ejemplo de referencia) - Obtención, purificación y caracterización de hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* según el documento US 4.258.134

- 35 Se cultivó *S. koganeiensis* 31394 ATCC como se describió en la sección Materiales y Métodos; el sobrenadante obtenido de la centrifugación, filtrado de manera adecuada con filtros de flujo tangencial, se sometió a cromatografía de intercambio aniónico débil en DEAE-celulosa. Brevemente, se equilibraron 1,2 kg de DEAE-celulosa con tampón de fosfato sódico 25 mM a pH 7,0 y se empaquetaron, después se cargó el sobrenadante, clarificado en el mismo tampón, en la columna y se eluyó con tampón de fosfato sódico 25 mM a pH 7,0 que contenía NaCl 250 mM; tras la cromatografía, se recogió la fracción que tenía actividad de hialuronidasa y se concentró mediante ultrafiltración, se dializó con 10 volúmenes de tampón acetato (pH 5,0) y se sometió a cromatografía de intercambio catiónico débil mediante el uso una columna de CM-celulosa. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de elución de tampón acetato 0,005-0,1 M. La fracción positiva para la actividad de hialuronidasa se recogió tras la cromatografía, se concentró mediante ultrafiltración y se dializó con 10 volúmenes de agua destilada (MilliQ, Millipore). El producto así obtenido se filtró en filtros de polietersulfona de 0,2 µm y se sometió a un ensayo para la determinación de la actividad de hialuronidasa, SDS-PAGE, electroforesis bidimensional y análisis densitométrico.
- 40
- 45

- Con respecto a la electroforesis bidimensional, cuyo resultado se informa en la Figura 1, se concentró una alícuota de 600 µl de la fracción con actividad de hialuronidasa obtenida de la cromatografía hasta un volumen de alrededor de 20 µl (alrededor de 864 U de hialuronidasa) mediante el uso de columnas BIOMAX 5k (Millipore). La alícuota concentrada se mezcló con 125 µl de tampón de carga (urea 8 M, 2% de CHAPS, ditiotreitól 50 mM (DTT), 0,2% (p/v) de anfolito Bio-Lyte 2/10 y azul de bromofenol) y se cargó en tiras IPG de pH 3-10 (ReadyStrips de 7 cm, BIO-RAD), incubando la muestra en la tira a 25 °C durante 11 h. Después de 11 h de absorción de la muestra, la tira se cargó en la celda PROTEAN IEF (BIO-RAD) para el isoelectroenfoque (IEF).
- 50

- Al final del isoelectroenfoque (primera dimensión), la tira se equilibró primero durante 15 min con un primer tampón [(urea 6 M, 2% de SDS, Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), 20% de glicerol, y 2% (p/v) de DTT], después con un segundo tampón [urea 6 M, 2% de SDS, Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), 20% de glicerol]. Tras el equilibrado, la tira se cargó en la
- 55

segunda dimensión en SDS-PAGE del 12%, mediante el uso de celdas Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD). Tras la electroforesis, el gel se tiñó con Azul de Coomassie PhastGel R y se analizó, tras el barrido, mediante el programa informático de obtención de imágenes como se describió en la sección Materiales y Métodos (Figura 1).

5 Ejemplo 2 - Obtención, purificación y caracterización de la hialuronidasa de *Streptomyces koganeiensis* según la invención

2a) Obtención y purificación

Preparación de muestras

10 El sobrenadante clarificado (alrededor de 30 litros), obtenido de la fermentación de *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, como se describió en la sección Materiales y Métodos, se concentró 10 veces mediante ultrafiltración a través de filtros de polietersulfona de un umbral de 10 kDa, y se midió su actividad de hialuronidasa. El sobrenadante concentrado se dializó después (10 volúmenes) con una disolución de acetato sódico 50 mM a pH 4,0 y se sometió a la etapa a).

Etapa a) Cromatografía de intercambio catiónico débil

15 El sobrenadante concentrado y dializado se cargó en 200 ml de resina CM-Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare), se empaquetó en una columna XK-50 (GE Healthcare) y se equilibró con 10 volúmenes de lecho (volúmenes de lecho, VL) de tampón de acetato sódico 50 mM a pH 4,0.

Tras la carga, la columna se lavó con 3 VL del mismo tampón, después las proteínas unidas se eluyeron con 3 VL de disolución tampón de acetato sódico 50 mM a pH 4,5. Las proteínas eluidas se recogieron en una única fracción que tuvo un volumen de alrededor de 200 ml, y se sometieron a un ensayo de actividad de hialuronidasa.

20 Etapa b) Diafiltración y cromatografía de intercambio aniónico fuerte

25 La fracción enzimáticamente activa obtenida en la etapa a) se sometió a diafiltración 10 veces con Tris-HCl 50 mM, pH 8, tampón de equilibrado, tras lo cual se cargó en una columna HiTrap® Q XL (5 ml), previamente equilibrada con 20 VL del mismo tampón. Tras la carga de la muestra, se llevó a cabo un lavado con 20 VL de tampón, después las proteínas unidas se eluyeron primero con 12 VL de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 35 mM a pH 8 para eliminar las impurezas compuestas de proteínas inactivas, tras lo cual la fracción enzimáticamente activa se eluyó con 14 VL de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM a pH 8 y se recogió en un volumen final de alrededor de 50 ml. El equilibrado, el lavado y la elución se llevaron a cabo a un caudal de 5 ml/min.

Etapa c) Cromatografía de intercambio catiónico fuerte

30 La fracción procedente de la etapa b) se diluyó 10 veces con tampón de acetato sódico 20 mM a pH 4 y se cargó en una columna HiTrap® SP FF, previamente equilibrada con 20 VL de la misma disolución. Tras un primer lavado con 20 VL de la misma disolución, las proteínas unidas se eluyeron con 10 VL de tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 4. Las proteínas eluidas se recogieron en una fracción que tuvo un volumen de alrededor de 45 ml, y se sometieron a un ensayo de actividad enzimática de hialuronidasa. El equilibrado, el lavado y la elución se llevaron a cabo a un caudal de 5 ml/min.

35 Etapa d) Cromatografía de intercambio aniónico fuerte

40 La fracción enzimáticamente activa obtenida en la etapa c) se diluyó 10 veces en tampón de acetato sódico 20 mM a pH 5,5 y se cargó en una columna Resource Q®, previamente equilibrada con 20 VL del mismo tampón. Después de cargar la muestra, se llevó a cabo un lavado con 20 VL del mismo tampón, después se redujo el pH a 5 y se llevó a cabo una elución con 10 VL de disolución, de tal manera que se eliminaron las impurezas compuestas de proteínas inactivas. El pH se redujo después adicionalmente a 4 y se llevó a cabo la elución con 15 VL de tampón. El segundo pico eluido a este valor de pH, que tuvo una absorbancia más elevada, se recogió en un volumen final de alrededor de 10-15 ml y se sometió a ultrafiltración y diálisis con 10 volúmenes de agua MilliQ (Millipore). El equilibrado, el lavado y la elución se llevaron a cabo a un caudal de 5 ml/min.

45 Todas las fracciones de proteínas eluidas, enzimáticamente activas o inactivas o poco activas, se analizaron después mediante SDS-PAGE del 12% como se describió en la sección Materiales y Métodos y después se tiñeron con tinción de plata según las instrucciones proporcionadas por el proveedor; en todas las fracciones con la actividad de hialuronidasa más elevada hubo presente una banda de proteína más marcada a alrededor de 25 kDa (Figura 3).

2b) Análisis y caracterización

Análisis de HPLC mediante filtración en gel

50 La fracción obtenida en la etapa d) se sometió a HPLC en columna de filtración en gel como se describió en la sección Materiales y Métodos. El resultado del análisis se informa en la Figura 4.

Espectrometría de masas

La fracción obtenida en la etapa d) se sometió a electroforesis en SDS-PAGE del 12%. Al final de la electroforesis, el gel se tiñó con Azul Brillante de Coomassie G-250 (BIO-RAD), y la proteína extraída del gel se digirió con tripsina (BIO-RAD). Se obtuvo un patrón de masas de péptidos mediante el uso del sistema MALDI-MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems). Las masas de péptidos obtenidas se usaron para las búsquedas en el banco de datos para la identificación de proteínas.

Secuenciación N-terminal

La fracción obtenida en la etapa d) se sometió a electroforesis SDS-PAGE en un gel del 12%, como se describió anteriormente, después a transferencia a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (BIO-RAD) y se tiñó según las instrucciones proporcionadas por el proveedor. La banda se extrajo con un escalpelo, tratando de obtener un fragmento del tamaño más pequeño posible (3 mm x 10 mm), y se cargó en la cámara de reacción del secuenciador.

Determinación de la actividad de hialuronidasa mediante SDS-PAGE no desnaturizante

Las muestras de proteínas en las que analizar la actividad enzimática de hialuronidasa [hialuronidasa y proteínas sin unir obtenidas en la etapa d) y hialuronidasa obtenida según la cromatografía del documento US 4.258.134] se separaron por duplicado en un gel de poliacrilamida del 8% en condiciones nativas impregnado con 0,17 mg/ml de ácido hialurónico. Tras la electroforesis, el gel se lavó tres veces con formiato sódico 0,1 M, NaCl 0,05 M, pH 4,0, y se incubó durante la noche en la misma disolución a 37 °C. El gel se lavó tres veces en ácido acético al 3% y se tiñó durante 2 h a temperatura ambiente en un 0,5% (p/v) de azul Alcian (SIGMA) y disolución de ácido acético al 3%. El gel se destiñó después en una disolución de acetato sódico del 7% durante al menos 1 h.

Las proteínas que exhibieron actividad de hialuronidasa se detectaron en forma de bandas pálidas sobre el fondo azul del gel [6]. Se usó como control una PAGE en condiciones nativas preparada de la misma manera, pero teñida con Azul Brillante de Coomassie G-250 (BIO-RAD) (Figura 6).

Elución pasiva de la proteína del gel de poliacrilamida en condiciones nativas

La banda de proteína con actividad de hialuronidasa se extrajo del gel de poliacrilamida en condiciones nativas teñido con Azul Brillante de Coomassie G-250 y se colocó en un tubo estéril de 1,5 ml. Se añadieron 0,5 ml de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, y EDTA 0,1 mM; pH 7,5) al fragmento extraído del gel, de tal manera que se sumergió completamente. El fragmento de gel se homogeneizó con una mano de mortero estéril y se incubó en un agitador orbital a 30 °C durante la noche. Tras la incubación, el gel homogeneizado se centrifugó a 5.000-10.000 x g (centrífuga 5402, Eppendorf) durante 10 min y el sobrenadante se extrajo con mucho cuidado y se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 ml. Tras concentrarlo 10 veces con una columna BIOMAX 5k (Millipore), se verificó en el sobrenadante la presencia de la proteína eluida mediante SDS-PAGE, y después se sometió a un ensayo de actividad de hialuronidasa y, como confirmación, a secuenciación N-terminal (Figura 5).

Determinación del peso molecular de la proteína mediante espectrometría de masas

Se mezcló 1 µl de hialuronidasa (alrededor de 0,5 µg) con 1 µl de una disolución compuesta de 20 µg/µl de ácido sinapínico (SA) en un 50% de acetonitrilo con un 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla obtenida se transfirió a una placa de MALDI y se sometió a análisis como se indicó en la sección Materiales y Métodos. El resultado del análisis se informa en la Figura 7.

Isoelectroenfoque

Una alícuota de 20 µl (20 µg) de la hialuronidasa obtenida en la etapa d) se mezcló con 125 µl de tampón de carga [urea 8 M, 2% de CHAPS, ditioneitol 50 mM (DTT), 0,2% (p/v) de anfolito Bio-Lyte 2/10 y azul de bromofenol] y se cargó en una tira IPG de pH 3-10 (ReadyStrips de 7 cm, BIO-RAD), incubando la muestra en la tira a 25 °C durante 11 h. Después de 11 h de absorción de la muestra, la tira se cargó para el isoelectroenfoque (IEF) en la celda PROTEAN IEF (BIO-RAD). Al final del isoelectroenfoque, la tira se secó con papel de filtro (Whatman), se humedeció con agua MilliQ, y se tiñó durante 45 min mediante el uso de una disolución de tinción de geles de IEF (BIO-RAD). La tira se destiñó durante 1 h o más con una disolución de desteñido (disolución de desteñido, Coomassie R-250, BIO-RAD). El punto isoelectrónico de la muestra se determinó mediante la comparación con los puntos isoelectrónicos de los patrones de referencia (marcador de IEF de pH 3-10, SERVA). El resultado del análisis se informa en la Figura 8.

Comparación entre las actividades enzimáticas de diferentes tipos de hialuronidasas

El resultado de este ensayo demuestra que la hialuronidasa según la invención tiene una actividad alrededor de tres veces mayor que la más activa de las usadas para la comparación (Figura 9).

Secuenciación

La secuenciación del extremo N-terminal, que se llevó a cabo como se describió en la sección Materiales y Métodos,

permitió establecer que contiene la secuencia de aminoácidos siguiente:

Ala-Gly-Glu-Asn-Gly-Ala-Thr-Thr-Thr-Phe-Asp-Gly-Pro-Val-Ala (SEQ ID N° 1)

Ejemplo 3 - Preparaciones farmacéuticas

Preparación 1 - Gel hidrófilo

Componentes	Cantidades (U.I. o mg/1 g de hidrogel)
Hialuronidasa	150 U.I.
Carbomer 974P	15 mg
Glicerol	100 mg
Propilen glicol	66,75 mg
Trietanolamina (TEA)	13,25 mg
Polietilenglicol 400	66,75 mg
p-Hidroxibenzoato de metilo	2 mg
p-Hidroxibenzoato de propilo	0,2 mg
Agua purificada	c.s. hasta 1 g

5

Se disolvió metil- y propil-parabeno en agua purificada a 80 °C. Después de enfriar la disolución hasta temperatura ambiente, se añadió hialuronidasa, agitando hasta que se disolvió completamente, tras lo cual se añadió PEG 400, continuando con la agitación hasta que se disolvió. A esta disolución se le añadió Carbomer® 974P, continuando con la agitación hasta la dispersión homogénea e hidratación completa de la misma, y después se añadió TEA para obtener la gelación de la fase acuosa. Finalmente, siempre con agitación, se añadió glicerol y propilen glicol.

10

Preparación 2 - Crema hidrófila (emulsión aceite/agua)

Componentes	Cantidades (U.I. o mg/1 g de crema)
Hialuronidasa	150 U.I.
Tefose 1500	110 mg
Glicerol	80 mg
Ácido esteárico	33 mg
Parafina líquida	40 mg
p-Hidroxibenzoato de metilo	1 mg
Agua purificada	c.s. hasta 1 g

15

Para la preparación de la fase oleosa, se fundió parafina líquida, ácido esteárico y Tefose® 1500 con agitación a 50 °C. Por separado, la fase acuosa se preparó mediante la disolución inicial de metil-parabeno a 80 °C, el enfriamiento posterior hasta temperatura ambiente y la incorporación de glicerol y hialuronidasa con agitación hasta que se disolvió completamente.

La fase acuosa se añadió a la fase oleosa, continuando con la emulsificación, tras lo cual la emulsión aceite/agua obtenida se enfrió con agitación hasta temperatura ambiente.

Preparación 3 - Pomada

Componentes	Cantidades (U.I. o mg/1 g de pomada)
Hialuronidasa	150 U.I.
Parafina líquida ligera	200 mg
Vaselina blanca	c.s. hasta 1 g

20

La base de pomada se preparó fundiendo parafina líquida ligera y vaselina blanca con agitación a 70 °C. Después

de enfriar a temperatura ambiente, se incorporó la hialuronidasa, mezclando hasta obtener una suspensión homogénea.

Preparación 4 - Lipogel

Componentes	Cantidades (U.I. o mg/1 g de lipogel)
Hialuronidasa	150 U.I.
Aceite de ricino hidrogenado	10 mg
Alcohol cetosteárico	50 mg
Vaselina blanca	365 mg
Parafina líquida ligera	c.s. hasta 1 g

- 5 Se fundió parafina líquida ligera, vaselina blanca y el alcohol cetosteárico con agitación a 90 °C, tras lo cual, con agitación, se añadió aceite de ricino hidrogenado (agente de lipogelación) hasta su disolución homogénea. Después de enfriar lentamente a temperatura ambiente, se incorporó la hialuronidasa, mezclando hasta obtener una suspensión homogénea.

Preparación 5 - Soluciones inyectables para uso intramuscular o subcutáneo

Componentes	Cantidades (U.I. o mg/ml de sol.)
Hialuronidasa	200 U.I.
Lactosa	0,93
Fosfato Potásico Dibásico	0,36
Fosfato Potásico Monobásico	0,23
Cloruro sódico	9

- 10 Se disolvió lactosa y hialuronidasa, con agitación, en solución salina tamponada a pH 6,4 - 7,2, preparada a temperatura ambiente, y la disolución así obtenida se filtró con filtros de 0,22 micras.

Referencias

- [1] Maclean, D., Fishbein, MC., Maroko, PR. y Braunwald AND. 1976. Science, 194: 99-200.
- 15 [2] Yoshida, K., Fujii, T., Kikuchi, H. 1981. Patente de EE.UU.: 4258134 y patente europea EP 0 005 751
- [3] Dorfman, A. 1955. Methods in Enzymology, 1: 166-173.
- [4] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature (Londres) 227:680-685.
- 20 [5] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- [6] Guntenhoener, M.W., Pogrel, M.A., y Stern, R. 1992. Matrix 12, 388-396.
- [7] Lachmann S, Rommeleare J, Nüesch JP. 2003. Novel PKCeta is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of minute virus of mice. J Virol 2003; 77(14):8048-60.

REIVINDICACIONES

1. La hialuronidasa de *Streptomyces koganei* ATCC 31394 que comprende la secuencia de aminoácidos N-terminal mostrada en SEQ ID N° 1 y que tiene un peso molecular de 21,6 kDa, un punto isoeléctrico (pI) que oscila de 4,4 a 4,8 y una actividad enzimática igual o mayor que 40.000 U.I./mg.
- 5 2. Un proceso para la preparación de la hialuronidasa según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:
 - a) someter al sobrenadante obtenido de la fermentación de *Streptomyces koganei* ATCC 31394 a cromatografía de intercambio catiónico débil y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa;
 - 10 b) someter a la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa de la etapa a) a diafiltración y cromatografía de intercambio aniónico fuerte y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa;
 - c) someter a la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa de la etapa b) a cromatografía de intercambio catiónico fuerte y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa;
 - d) someter a la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa de la etapa c) a cromatografía de intercambio aniónico fuerte y aislar la fracción de proteína con actividad de hialuronidasa.
- 15 3. La hialuronidasa según la reivindicación 1 para el uso como medicamento.
4. La hialuronidasa según la reivindicación 3 para el uso en el tratamiento de enfermedades en las que la degradación de ácido hialurónico en los tejidos u órganos afectados es ventajosa o deseable.
5. La hialuronidasa para el uso según la reivindicación 4, en la que la enfermedad se selecciona de edema, inflamación, sabañón, tumores sólidos, alergias mediadas por IgE, enfermedades orales y hemorragias vítreas espontáneas.
- 20 6. La hialuronidasa para el uso según la reivindicación 4, en la que la enfermedad es la mastitis bovina.
7. Las composiciones farmacéuticas o veterinarias que contienen la hialuronidasa de la reivindicación 1 mezclada con excipientes y/o vehículos adecuados.
8. Las composiciones según la reivindicación 7 en forma de preparaciones inyectables o de preparaciones tópicas para aplicación epidérmica, transdérmica u oftálmica.
- 25 9. Las composiciones según la reivindicación 7 ó 8 que contienen además uno o más principios activos seleccionados de: antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes antitumorales, alérgenos, anestésicos locales, antibióticos, anticuerpos monoclonales, citocinas, enzimas y ácido hialurónico sulfatado.
10. Las composiciones según la reivindicación 9, en las que el principio activo es ácido hialurónico sulfatado y la composición tópica para aplicación epidérmica está en forma de crema, gel, pomada o aerosol.
- 30 11. El uso de la hialuronidasa según la reivindicación 1 como reactivo en ensayos bioquímicos para la determinación cuali/cuantitativa de ácido hialurónico.

FIG. 1

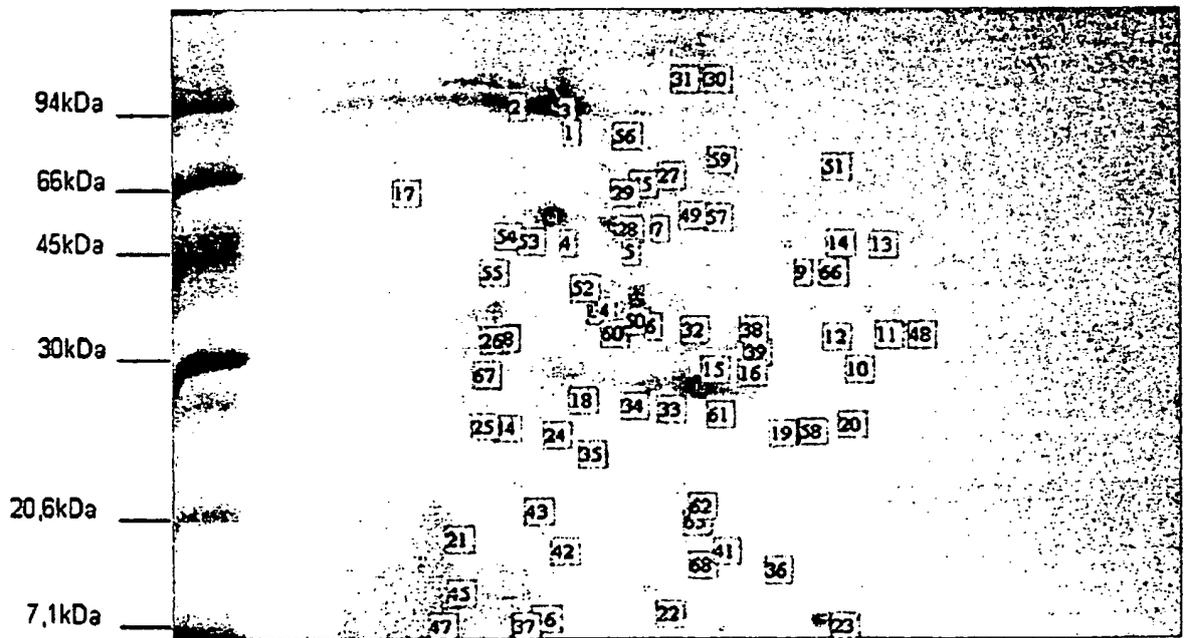
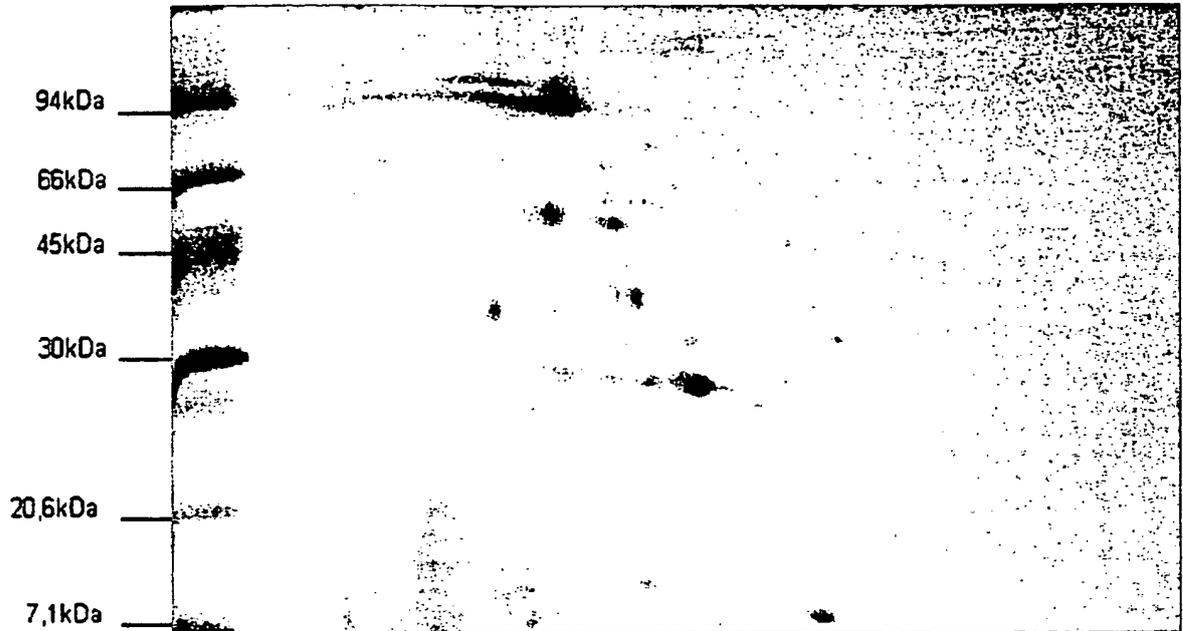


FIG. 2

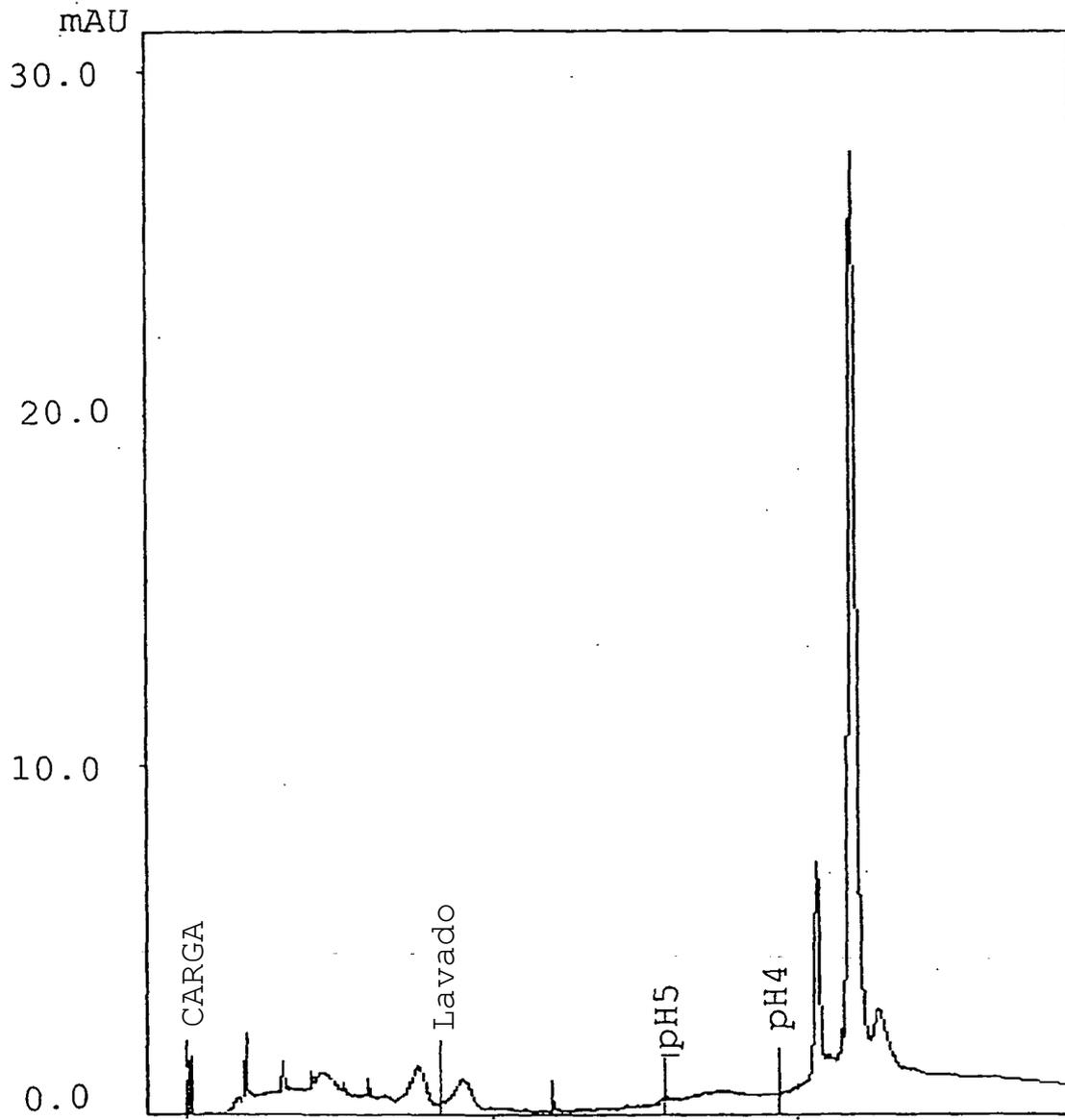


FIG. 3

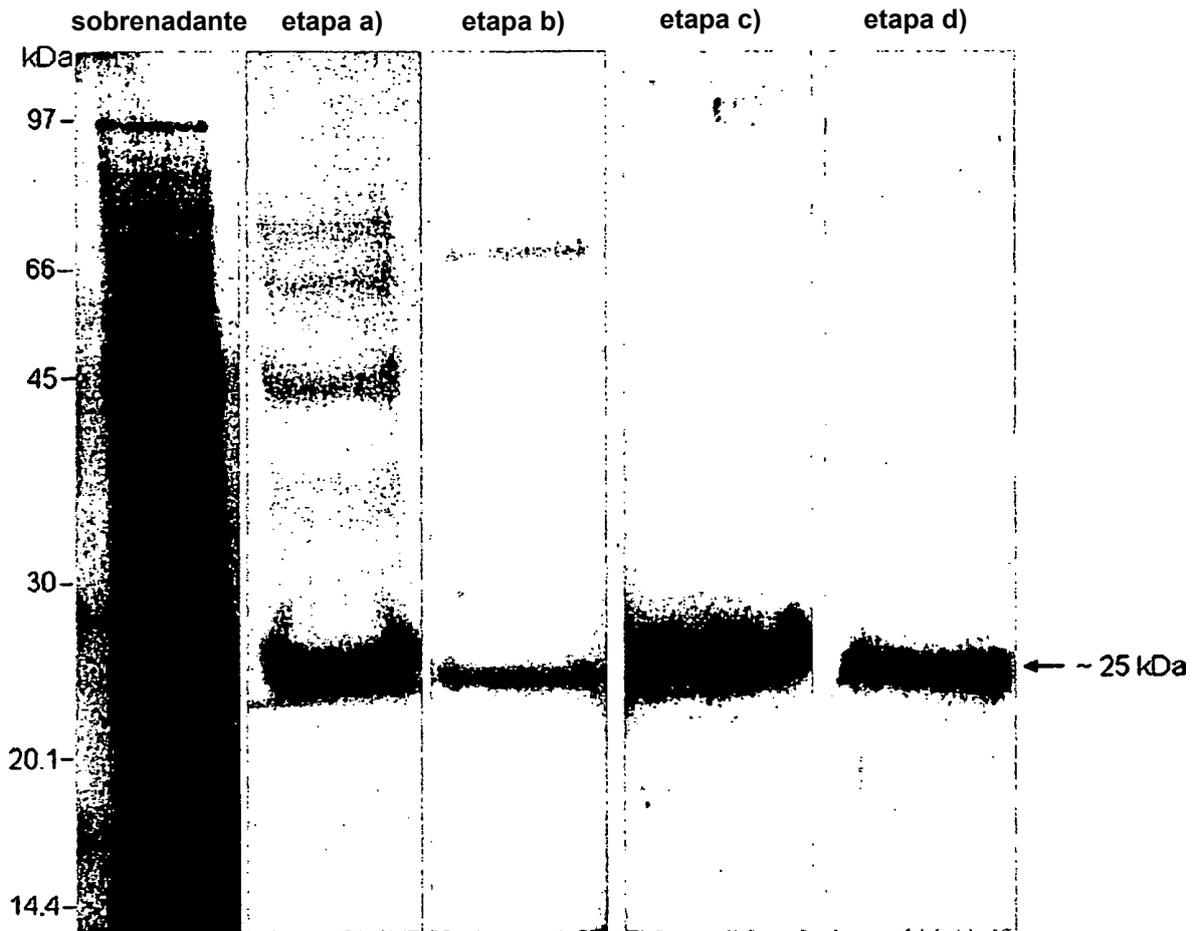


FIG. 4

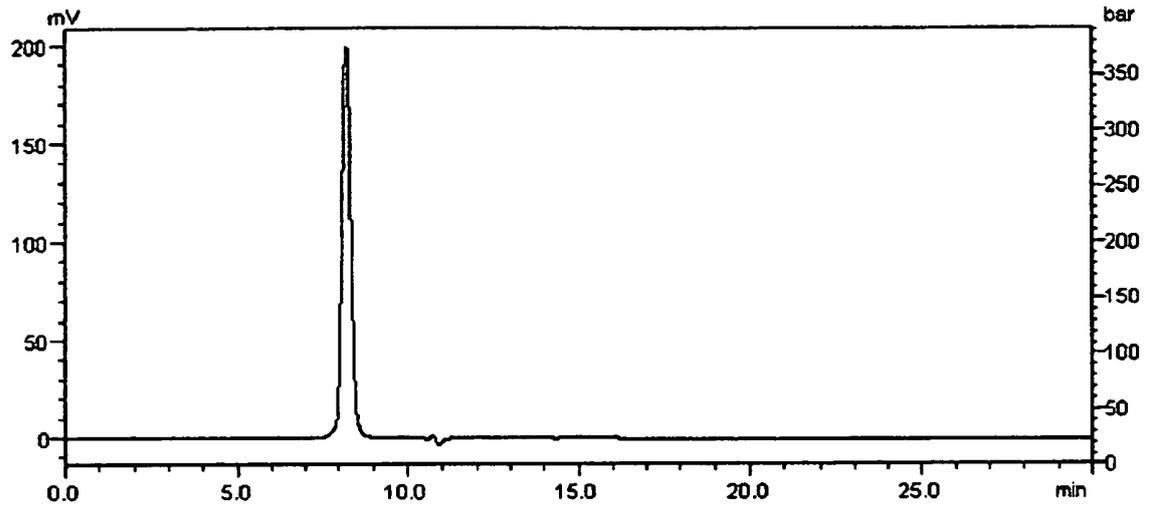


FIG. 5a

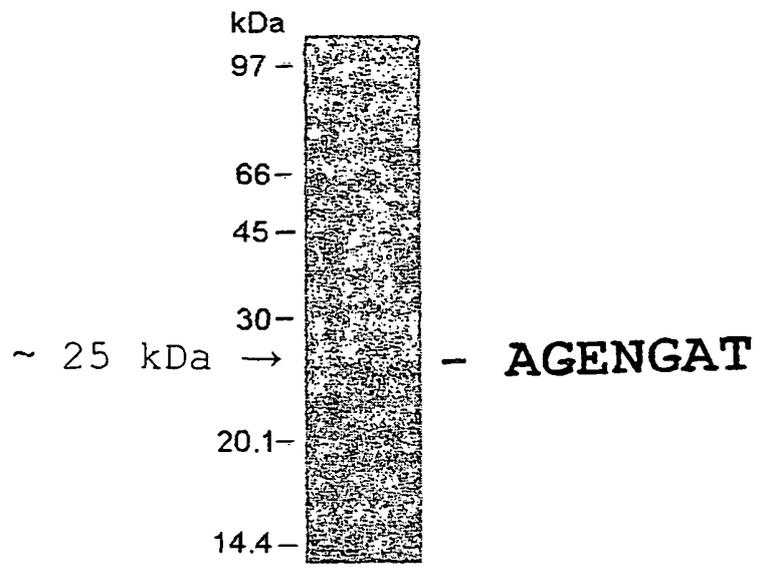


Fig. 5b

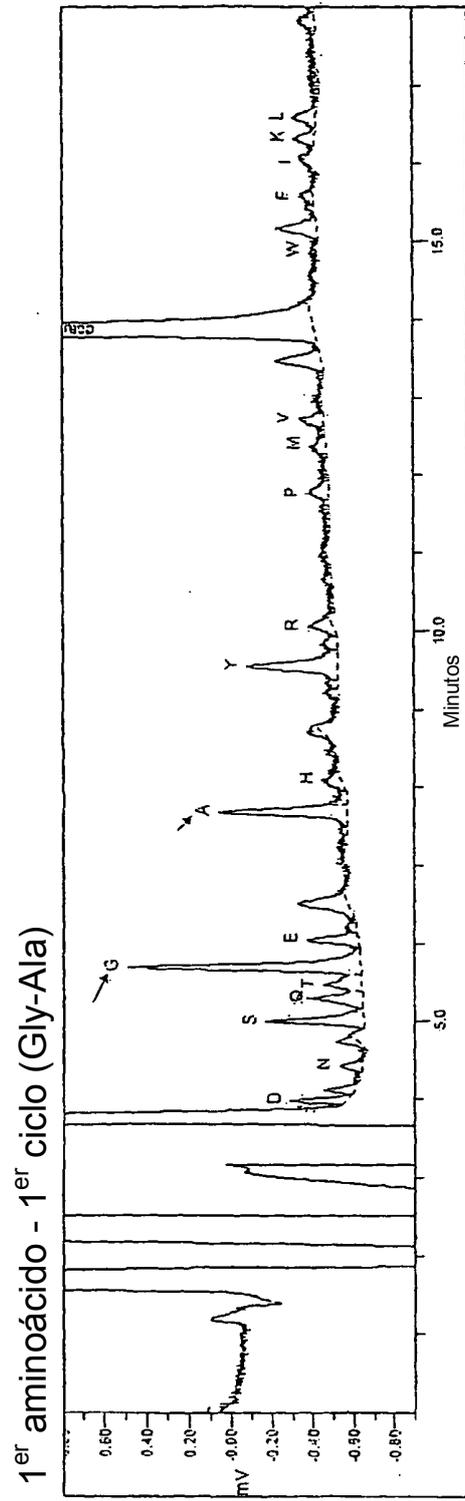


Fig. 5c

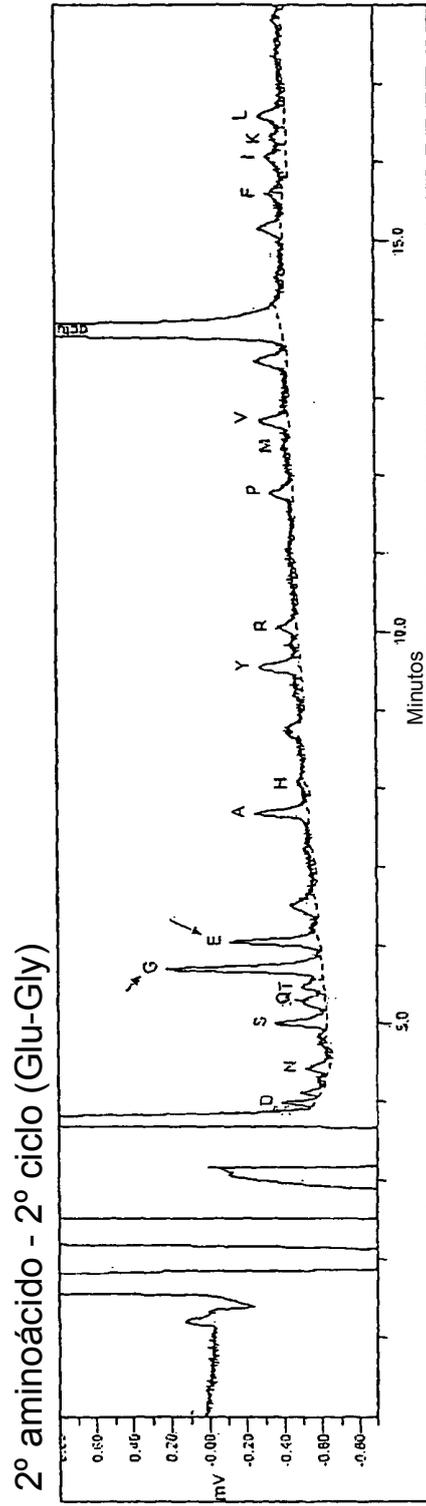
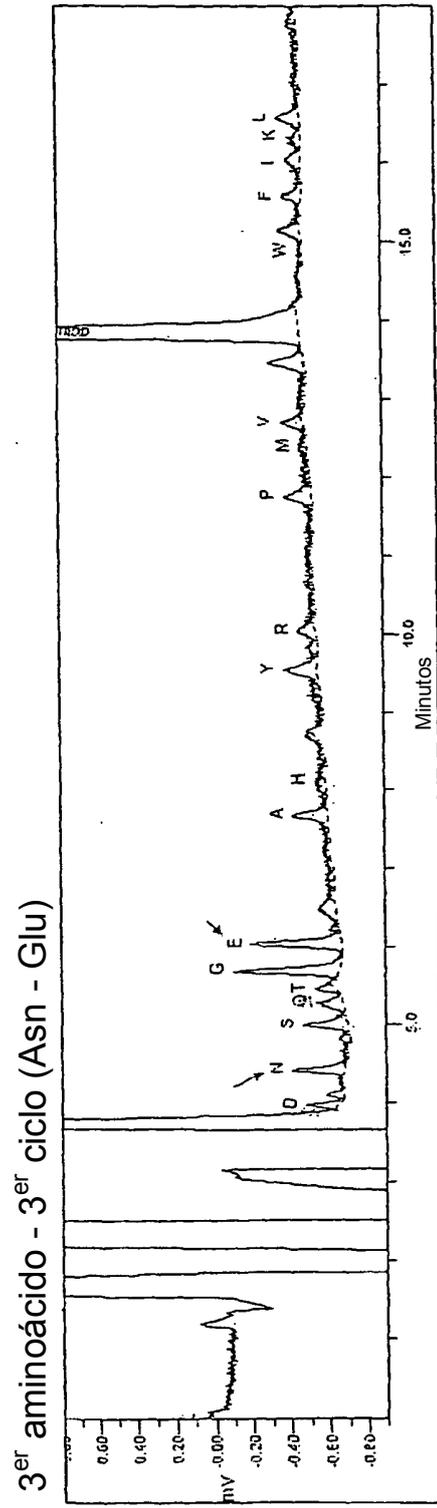


Fig. 5d



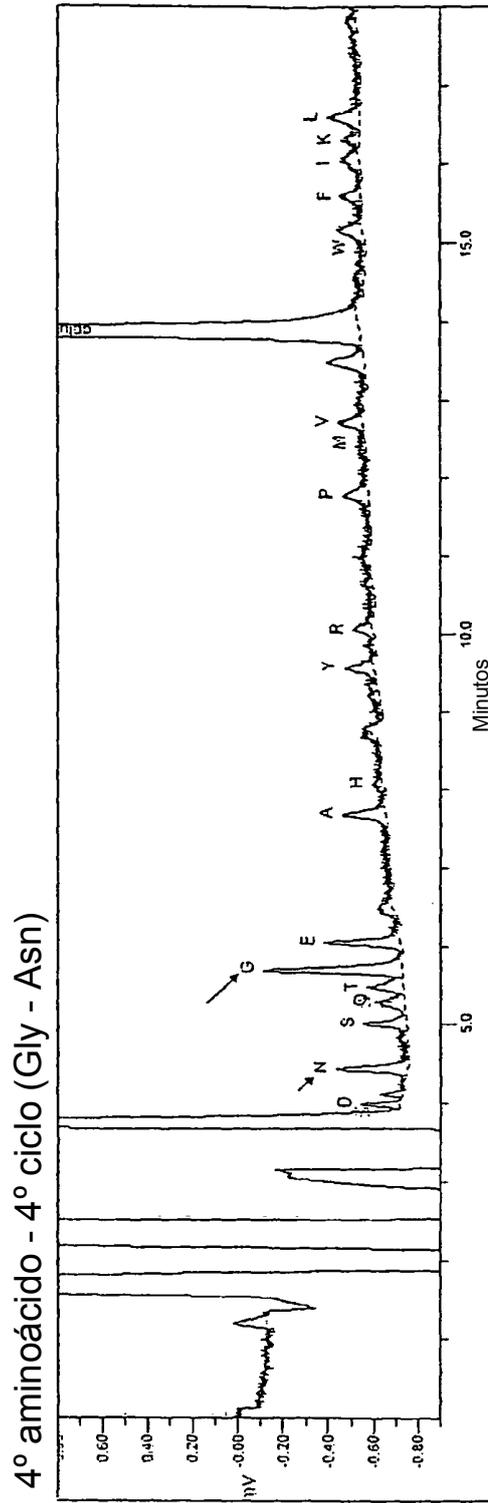


Fig. 5e

Fig. 5f

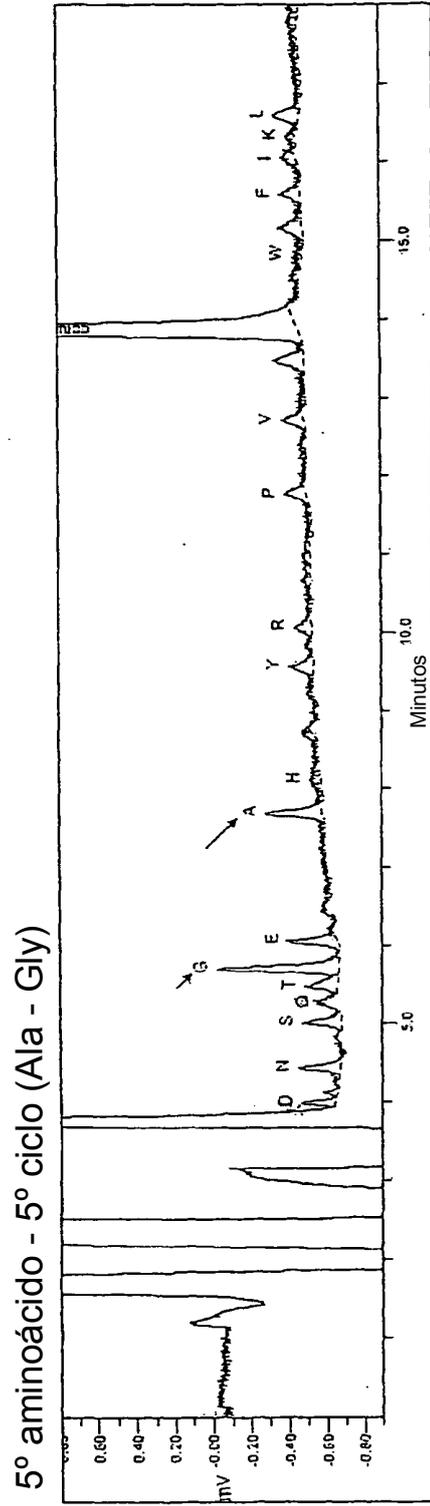


Fig. 59

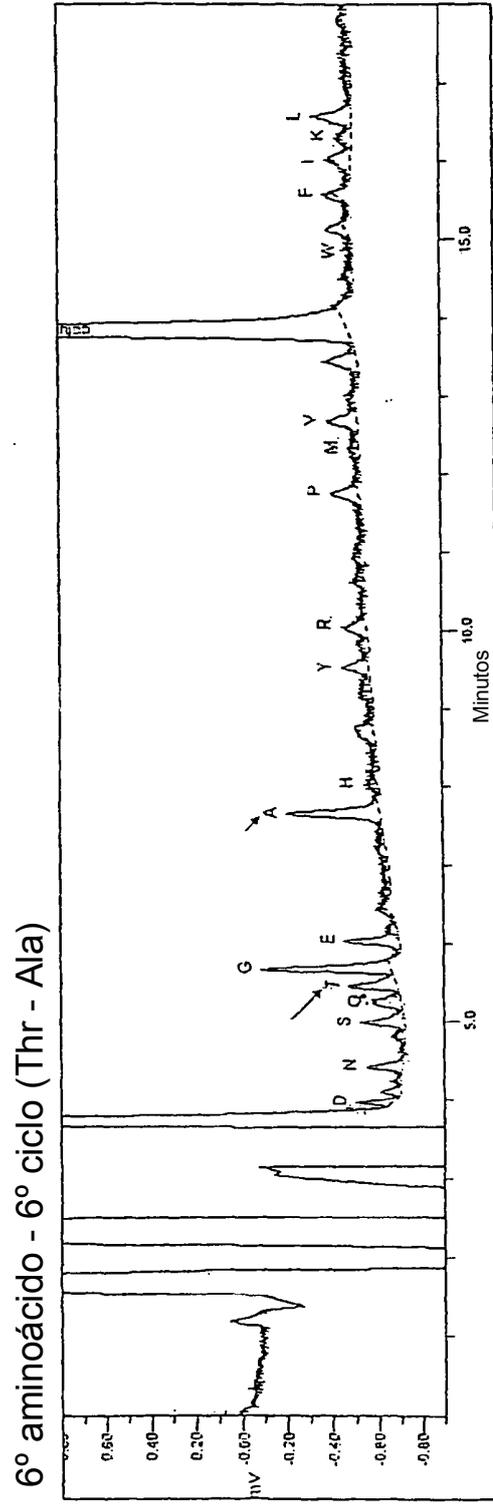


Fig. 5h

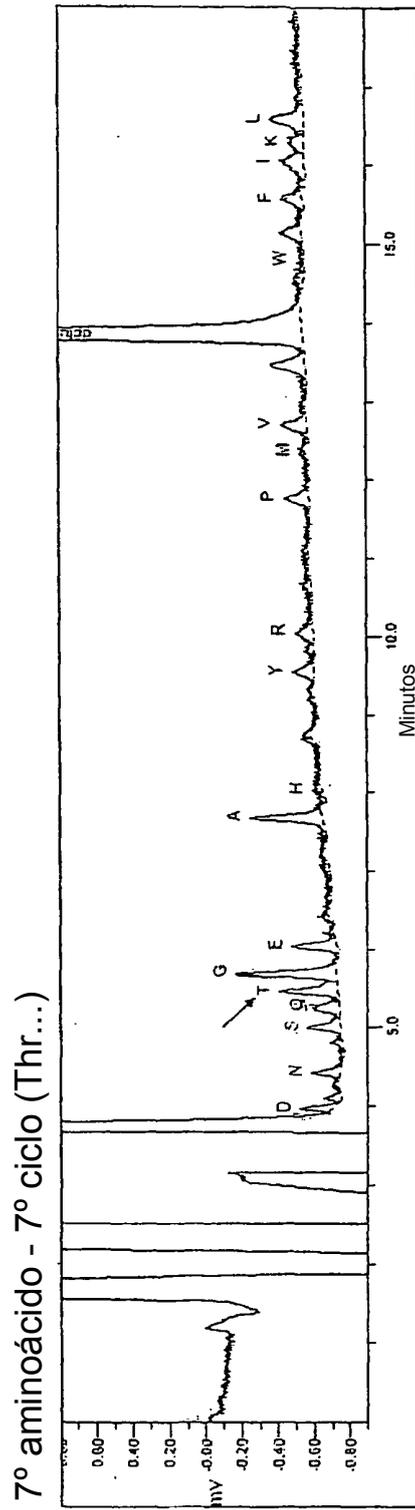


FIG. 6

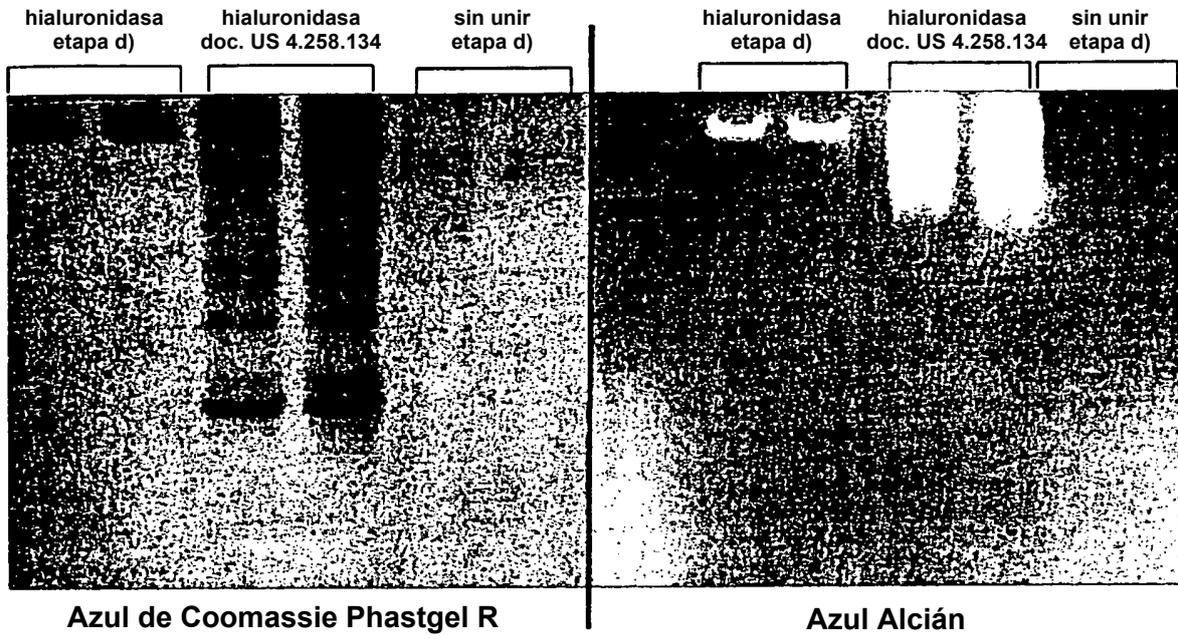


FIG. 7

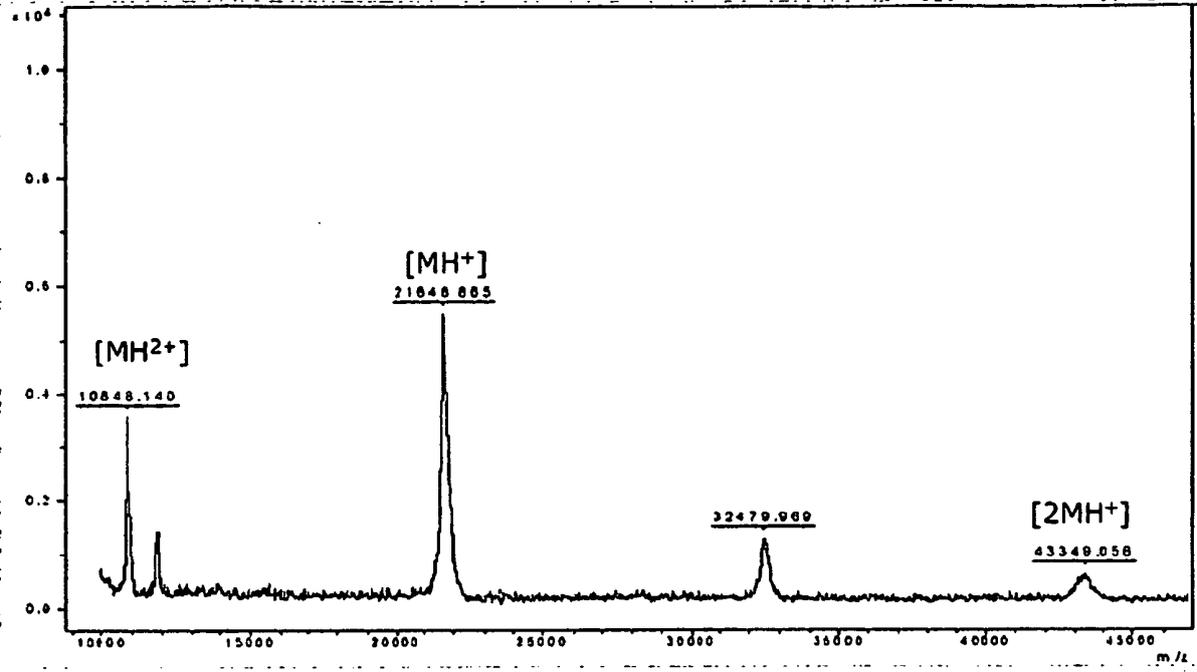


FIG. 8

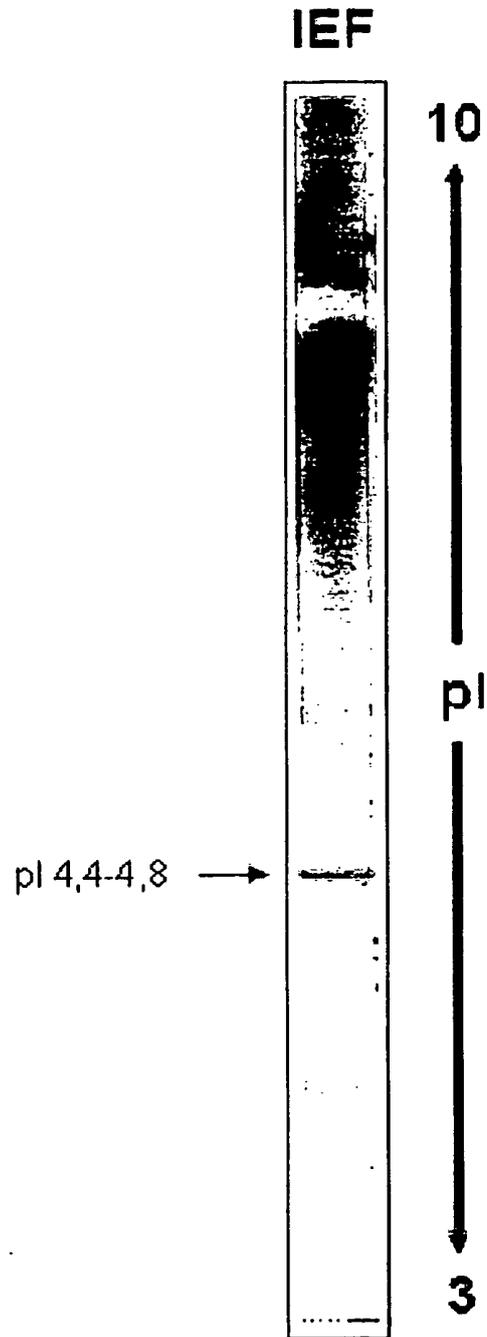


FIG. 9

