

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 349**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11773677 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2621520**

54 Título: **Composiciones de colagenasa G y colagenasa H para el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones del colágeno**

30 Prioridad:

30.09.2010 ES 201001255

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

19.02.2015

73 Titular/es:

**PROTEOS BIOTECH S.L.U. (100.0%)
C/ Almansa 14
02006 Albacete, ES**

72 Inventor/es:

MUÑOZ MONTANO, JUAN RAMÓN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 529 349 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

Composiciones de colagenasa G y colagenasa H para el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones del colágeno

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, biotecnología y medicina, y se refiere a la utilización de colagenasa G y colagenasa H para el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones del colágeno, y las formulaciones que contienen dichas enzimas. En particular, se refiere a la utilización de estas dos enzimas en una proporción de colagenasa G y colagenasa H en una relación de 1:2,5 y 1:3,5, preferentemente de 1:3, y a su uso secuencial, administrando primero colagenasa G y luego colagenasa H, o en una utilización simultánea usando un sistema de liberación controlada basado en un gel de ácido hialurónico.

10 **Antecedentes de la invención**

15 El colágeno es el principal componente estructural en los mamíferos y constituye una gran proporción del contenido proteico total de la piel y otras partes del cuerpo. Numerosos episodios de traumatismos de la piel, tales como quemaduras, cirugías, infecciones y accidentes, se caracterizan frecuentemente por una acumulación errática de tejido fibroso rico en colágeno y por un alto contenido en proteoglicanos. Además de actuar reparando el tejido normal que se ha destruido o dañado, el colágeno también se acumula de forma errática formando fibras, cicatrices y cordones que en determinadas condiciones pueden producir algunas deformaciones (contracturas, cicatrices retráctiles). El exceso de colágeno se ha atribuido a un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de colágeno.

20 Numerosas enfermedades y estados patológicos se asocian con depósitos de exceso de colágeno y acumulación errática de tejido fibroso rico en colágeno. Dichas enfermedades y condiciones patológicas se han denominado colectivamente como "enfermedades que cursan con alteraciones del colágeno". Se han usado colagenasas para tratar dichos trastornos que cursan con alteraciones del colágeno.

25 Las colagenasas son peptidasas que se unen y cortan específicamente a secuencias que contienen aminoácidos Pro-X-Gly-Pro, donde X es normalmente un aminoácido neutro. Estas secuencias se encuentran frecuentemente en el colágeno y raramente se encuentran en otras proteínas, lo que explica la alta especificidad por sustratos de estas enzimas. Adicionalmente, mientras que otras enzimas son capaces de degradar colágeno desnaturalizado, las colagenasas son las únicas enzimas capaces de reconocer específicamente colágeno natural e hidrolizarlo. (Seifter y Harper, 1970. *Methods Enzymol.* 19, 613-635; Harper, 1980. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 1063-1078; Peterkofsky 1982. *Methods Enzymol.* 82, 453-471).

30 Actualmente, el tratamiento de las enfermedades relacionadas con colágeno se lleva a cabo usando una combinación de colagenasa G y H en una relación 1:1, dichas enzimas se producen por fermentación de *Clostridium histolyticum* y se purifican cromatográficamente, (WO2007/089851A3). Algunas de dichas enfermedades relacionadas con la acumulación atípica de colágeno son la enfermedad de Dupuytren (US005589171A), y enfermedades oftálmicas (US4174389).

35 En todos los casos, se presenta la utilización de estas enzimas como una mezcla de colagenasas (Col I y Col II o Col G y Col H). Esto es porque hasta hoy los procedimientos para obtener estas enzimas han sido por purificación del sobrenadante de cultivo celular total o fermentación de *Clostridium histolyticum* en forma de medio. En el medio de cultivo total de dichas fermentaciones se obtienen tanto ColG como ColH en el mismo momento en una proporción de 1:1. En etapas adicionales de purificación que usan cromatografía se obtiene una mezcla de ambas enzimas ColG y ColH a fin de ser usada como fármaco, como es el caso de Xiaflex, el primer medicamento basado en colagenasas que se ha aprobado por la FDA para tratar la contractura de Dupuytren.

40 Xiaflex está presente como un polvo liofilizado que se necesita reconstituir en un disolvente adecuado justo antes de su utilización. La dosis es de 0,58 mg por inyección en un cordón metacarpofalángico o interfalángico palpable, se administra cada 2 horas en 3 posiciones ligeramente diferentes en el cordón, hasta 3 veces por cordón en intervalos de 4 semanas.

45 Xiaflex contiene colagenasa AUX-I y colagenasa AUX-II, aisladas y purificadas a partir del medio de fermentación de *Clostridium histolyticum*.

La colagenasa AUX-I es una cadena sencilla de aminoácidos con peso molecular observado de 114 kilodaltons (kDa). Pertenece a las colagenasas clase I de *Clostridium histolyticum*.

50 La colagenasa AUX-II es una cadena sencilla de polipéptidos con un peso molecular observado de 113 kDa. Pertenece a las colagenasas clase II de *Clostridium histolyticum*.

55 Sin embargo, estos tratamientos tienen limitaciones derivadas de la naturaleza del producto final (una solución acuosa de colagenasas AUXI y AUXII reconstituidas), la fuente de estas enzimas (*C. hystoliticum*) y la combinación de estas colagenasas G y H en una proporción de 1:1. Todos estos factores hacen del medicamento actual un producto cuya actividad es difícil de controlar, también a causa de la manera en la que se libera en el área afectada, siendo sus efectos secundarios principales:

1. Ruptura del tendón normal en el área de tratamiento.
2. Daño grave en los ligamentos de los dedos a tratar.
3. Reacciones alérgicas derivadas de la penetración del producto en el torrente circulatorio.
4. Problemas de coagulación derivados de la alteración de las membranas basales de los vasos sanguíneos.
- 5 5. CRPS (*síndrome de dolor regional complejo*),
6. Edema periférico.
7. Dolor y hematomas.

Estos efectos secundarios derivan principalmente de la invasión a áreas circundantes de la inyección de una solución acuosa de colagenasas. Una vez inyectada la solución acuosa, se podría diseminar libremente a áreas adyacentes produciendo la degradación de tendones sanos, produciendo inmovilidad de articulaciones e incluso extenderse hasta la ruptura de tendones sanos y la ruptura de vasos sanguíneos próximos, creando episodios de hemorragia interna que son dolorosos para el paciente e invasión del producto farmacológico en el flujo sanguíneo.

Por tanto, es necesario encontrar un medicamento, otra alternativa farmacéutica que permita obtener los mismos resultados sin los efectos secundarios observados en los medicamentos actuales.

15 Descripción de la invención

Composición de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado una composición que comprende colagenasa G (ColG o AUX-I) y colagenasa H (ColH o AUX-II), siendo estas colagenasas preferentemente enzimas recombinantes (rColG y rColH), en una proporción precisa que muestra la mejor actividad sinérgica. Dichas composiciones, adicionalmente, se pueden formular como un gel, a fin de tener determinadas ventajas, tales como la reducción de la dosis (cantidad de enzimas) necesaria, una eficacia aumentada de las composiciones en el área de tratamiento, la reducción de los efectos secundarios típicos observados en otras formulaciones que contienen colagenasas, la mejora de la estabilidad del medicamento y, por ende, la reducción en el número de administraciones necesarias para obtener el efecto terapéutico deseado.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante en el presente documento composición de la invención, que comprende colagenasa G y colagenasa H en una relación de entre 1:2 y 1:4. En otras palabras, la composición de la invención tiene de entre dos a cuatro veces más colagenasa H que colagenasa G, es decir, la relación de masa de las colagenasas es de entre 1:2 y 1:4 (G/H)

Como se muestra en la Fig. 1, las enzimas colagenasas, cuando se administran en una composición en dichas proporciones, muestran un efecto sinérgico fuerte. Este efecto sinérgico se explica debido a la naturaleza de cada una de estas enzimas. Las fibras de colágeno natural son resistentes a la hidrólisis enzimática debido a que tienen una superficie expuesta escasa. Es debido a esta razón por la que, para una fase inicial de hidrólisis, se requiere una enzima con gran afinidad por el colágeno natural, tal como colagenasa G. Esta colagenasa tiene dos regiones específicas para la unión al colágeno (Figura 2), lo que la hace esencial en una primera fase de hidrólisis.

Una vez que la fibra de colágeno está parcialmente hidrolizada, la fibra es más susceptible de hidrolizarse por otras enzimas colagenolíticas más activas, pero menos específicas tales como el caso de la colagenasa H. La colagenasa H muestra la actividad más alta (Figura 1), pero menor afinidad por colágeno debido a que solo tiene un dominio de unión a colágeno (Figura 2). Es debido a esta razón por la que la utilización conjunta de ColG y ColH muestra un efecto sinérgico.

La utilización de diferentes proporciones (ColG/H 1:2-1:4) que aquellas observadas en la naturaleza (ColG/H 1:1) ha demostrado tener una eficacia más alta en la hidrólisis de fibras de colágeno. En una etapa adicional, puesto que se aumenta la superficie específica del colágeno, la acción de ColH es más eficaz a causa de su actividad específica más alta (figura 3).

En una realización preferente, las colagenasa G y colagenasa H se encuentran en la composición de la invención en una relación de entre 1:2,5 y 1:3,5. En una realización más preferente, las colagenasa G y colagenasa H de la composición de la invención se encuentran en una relación de 1:3 (Figura 3).

Como se ha descrito, en términos generales, las enzimas colagenolíticas comerciales se producen a partir de bacterias del género *Clostridium*. Sin embargo, la producción recombinante de dichas enzimas colagenolíticas muestra una serie de ventajas, tales como la posibilidad de producir las enzimas colagenasa G y colagenasa H por separado, y de esta manera adecuar sus concentraciones, así como permitir la utilización de colagenasa G y H de manera secuencial en el tratamiento de diversas enfermedades y la posibilidad de hacer un seguimiento diferencial del comportamiento de

ambas enzimas proteolíticas una vez se ha inyectado en el organismo, bien mediante el uso de marcadores internos o bien debido a cada colagenasa por separado.

5 En la naturaleza, las colagenasas G y H se producen en las mismas cantidades, lo que implica una serie de dificultades si se quieren obtener proporciones de una relación deseada. La razón primordial es que es difícil separar las colagenasas G y H a causa de la similitud alta entre ambas. La purificación se lleva a cabo por cromatografía de exclusión por tamaño, intercambio catiónico y aniónico. Las enzimas obtenidas de esta manera muestran una actividad de alrededor de 500 CDU/mg e impurezas medidas en la actividad de caseinasa de alrededor de 50 U/mg.

10 En una realización preferente, la composición de la invención es una composición farmacéutica. En otra realización preferente, la composición de la invención también contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. En todavía otra realización más preferente de la invención, la composición de la invención también contiene otro ingrediente activo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento, o, de forma alternativa, a la composición de la invención para su uso como medicamento.

Kit de partes de la invención

15 En otro aspecto de la invención se describe un kit de partes (a continuación en el presente documento kit de partes de la invención) que comprende al menos colagenasa G y colagenasa H en una relación de entre 1:2 y 1:4. En una realización preferente, las colagenasa G y colagenasa H se encuentran en una relación de entre 1:2,5 y 1:3,5 en el kit de partes de la invención. En una realización más preferente, las colagenasa G y colagenasa H se encuentran en una relación de 1:3. en el kit de partes de la invención. En otra realización preferente, el kit de partes de la invención es un kit de partes farmacéutico.

20 En otra realización preferente, el kit de partes de la invención también contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. En todavía otra realización más preferente de la invención, la composición de la invención también contiene otro ingrediente activo.

25 El kit de partes puede comprender formulaciones separadas de colagenasa G y colagenasa H. Las formulaciones separadas de colagenasa G y colagenasa H se pueden administrar secuencialmente, por separado y/o simultáneamente (opcionalmente de forma repetida). Así, se pueden administrar los dos ingredientes activos, bien como una parte de la misma composición farmacéutica o bien en composiciones farmacéuticas separadas. La colagenasa G se puede administrar previamente a, al mismo tiempo que, o posteriormente a la administración de colagenasa H, o en alguna combinación de las mismas. En una realización preferente, se administra colagenasa G antes de colagenasa H.

30 Forma farmacéutica de la invención

35 Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, a continuación en el presente documento forma farmacéutica de la invención, que comprende una cualquiera de las composiciones o kit de partes de la invención. En una realización preferente, la forma farmacéutica de la invención se selecciona de la lista que comprende: ungüento, pomada, crema, pasta, solución, suspensión, emulsión, loción, linimento, gel, espuma, polvo, o cualesquiera de estas formas combinadas.

40 El uso de hidrogeles acoplados a las enzimas permite la liberación controlada del ingrediente activo y, con esto, permite disminuir los efectos secundarios debido a la acción de las enzimas en tejidos circundantes al área de tratamiento. Por consiguiente, en otra realización preferente de la invención, la forma farmacéutica es un gel, y en una realización todavía más preferente de la invención, son un hidrogel y/o un gel de ácido hialurónico. Como se usa en el presente documento, el término "forma farmacéutica" se refiere preferentemente a la mezcla de uno o más ingredientes activos con o sin aditivos que muestran características físicas para la dosis, conservación, administración y biodisponibilidad adecuadas.

45 Los hidrogeles son materiales poliméricos entrelazados en una red tridimensional, bien de origen natural o sintético, que aumenta de tamaño cuando se pone en contacto con agua, formando un material elástico y suave, y que mantiene una parte significativa del hidrogel sin disolverlo. Los geles se clasifican en dos tipos en función de la naturaleza de los enlaces en la red tridimensional: geles físicos y geles químicos.

50 Las colagenasas son proteínas extremadamente inestables en soluciones acuosas, incluso a temperaturas bajas, y también se pueden desnaturalizar fácilmente por quelantes y varios iones metálicos que pueden interaccionar con el ion de calcio que es esencial para la actividad enzimática. También, estas enzimas son extremadamente vulnerables a procedimientos fisicoquímicos, tales como congelación, descongelación, liofilización y secado, procedimientos que normalmente se necesitan durante las preparaciones de las formulaciones o formas farmacéuticas finales.

55 Los autores de la presente invención han desarrollado una nueva formulación de enzimas colagenasa G y colagenasa H en un gel de ácido hialurónico, de tal manera que se obtienen concentraciones enzimáticas de entre 500 a 3000 CDU/mg en ácido hialurónico, dichas concentraciones son necesarias para asegurar la actividad eficaz en tendones, y en que las enzimas no se desnaturalizan fácilmente y se enfrentan mejor a los cambios fisicoquímicos.

También, se ha demostrado el papel del ácido hialurónico en el control de la proliferación de queratinocitos y en el depósito de colágeno en heridas, reduciendo la formación de tejido fibrótico y, por consiguiente, la cicatrización patológica (John Chen W.Y. et ál., 1997. *Wound Repair and Regeneration* 7:79-89).

5 Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a un gel de ácido hialurónico que comprende la composición de la invención. En una realización preferente, las concentraciones de ácido hialurónico en el gel de la invención oscilan de entre el 0,05 % al 4 % (peso/peso o p/p). En una realización más preferente, la concentración de ácido hialurónico en el gel de la invención es del 1,5 % p/p.

10 En otra realización preferente de la invención, las concentraciones de colagenasas son más altas de 400 CDU/mg, en una realización más preferente oscilan de entre 450 a 5000 CDU/mg de ácido hialurónico, y en una realización todavía más preferente oscilan entre 500 y 3000 CDU/mg de ácido hialurónico.

El peso molecular del ácido hialurónico depende, entre otros factores, de la fuente de donde se obtiene (por ejemplo, incluyendo pero sin estar limitada a: líquido sinovial, cordón umbilical, piel, bacterias mediante procedimiento de fermentación o aislamiento directo), extendiéndose hasta 5000 kDa (Milas *et ál.*, 2001. *Biopolymers* 59: 191-204).

15 Entonces, en otra realización preferente, el peso molecular del ácido hialurónico oscila entre 600 y 4000 kDa, e incluso más preferentemente entre 700 y 3000 kDa. En una realización particular preferente de la invención, el ácido hialurónico tiene un peso molecular de 850 kDa.

20 También es equivalente cualquier gel creado con consistencia similar que emplee ácido hialurónico con pesos moleculares más altos o más bajos y concentraciones en soluciones acuosas que oscilen entre el 0,05 % al 4 %. Entonces, se pueden usar derivados de ácido hialurónico, entre ellos y sin excluir otros, sales de ácido hialurónico formadas con bases orgánicas e inorgánicas (documento EP0138572 B1), ésteres de AH con alcoholes de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica o heterocíclica, con un porcentaje de amidación de entre el 1 al 10 % y preferentemente del 4 % (documento EP 1095064 B1); derivados de O-sulfatos de AH hasta el 4.º grado de sulfatación (documento EP0702699 B1); ésteres internos del AH con un porcentaje de esterificación interna de entre el 0,5 al 10 % y preferentemente del 5 % (documento EP 0341745 B1); derivados de desacetilación de la fracción de N-acetilglucosamina con un porcentaje de desacetilación preferentemente de entre el 0,1 al 30 %, mientras que todos los grupos carboxilo del AH podrían formar sales con bases orgánicas e inorgánicas (patente EP1313772 B1); derivados percarboxilados del AH obtenidos a partir de la oxidación del grupo hidroxilo primario de la fracción de N-acetilglucosamina con una grado de percarboxilación de entre el 0,1 al 100 % y preferentemente entre el 25 y 75 %. Todos los grupos carboxilo del AH podrían formar sales con bases orgánicas y/o inorgánicas (documento EP1339753).

30 La densidad del ácido hialurónico tiene que ser suficiente para permitir el tratamiento local y la liberación continua y controlada del ingrediente activo, las colagenasas. La densidad óptima del gel con ácido hialurónico de 850 kDa y colagenasas se obtiene con concentraciones de ácido hialurónico del 1,5 %, que permite obtener una consistencia adecuada para la inyección en fibras de colágeno, manteniendo localmente el ingrediente activo y permitiendo su liberación controlada en el área de administración. Entonces, en una realización particular de la invención, cuando el peso molecular del ácido hialurónico es de 850 kDa, la concentración de este ácido hialurónico en el gel es del 1,5 % p/p.

Las características del ácido hialurónico en el gel permiten su liofilización para conservar el ingrediente activo con el tiempo. También, el ácido hialurónico una vez liofilizado necesita reconstituirse en agua para obtener un gel con una consistencia similar a la del inicial.

40 Para el tratamiento de las enfermedades derivadas de la formación atípica de colágeno, se usará preferentemente en dosis que varían de entre 2000 a 8000 CDU, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Preferentemente la dosis es de entre 3000 y 7000 CDU, y más preferentemente es de 4000 CDU aproximadamente, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. La cantidad en mg necesaria para formular una dosis de 4000 CDU está directamente relacionada con las unidades en CDU/mg de cada lote, de modo que siempre sería necesario referirse a la cantidad en unidades en lugar de en mg de enzima. Teniendo en cuenta que la actividad promedio de las enzimas es de 3500 CDU/mg en diferentes lotes, la cantidad en mg necesaria para cada dosis sería de alrededor de 1,1 mg por dosis de 4000 CDU (4000 CDU son equivalentes a 13300 unidades ABC).

50 Definición de CDU: una unidad de colagenasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg en un segundo a pH=7,1 a 37 °C (PZ = 4-fenil-azobenciloxicarbonilo) (Wunsch *et ál.*, 1963. *Physiol. Chem.*, 333: 149 (-151).

Usos de las composiciones, kit de partes, y formas farmacéuticas de la invención

Los autores de la presente invención han demostrado que las composiciones, el kit de partes, y formas farmacéuticas de la invención, incluyendo los hidrogeles de ácido hialurónico (o sus derivados), que comprenden las proporciones de colagenasa G y colagenasa H descritas previamente, son útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con deformaciones atípicas del colágeno.

Por tanto, otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención, o al uso por separado, simultáneo o secuencial de los ingredientes activos (colagenasa G y colagenasa H) del kit de partes de la invención, o al uso de la forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento. De forma alternativa, se refiere a la composición de la invención, al kit de partes de la invención, o a la forma farmacéutica de la invención, para su uso en la elaboración de un medicamento. En una realización preferente, la forma farmacéutica de la invención es un hidrogel de ácido hialurónico, tal como se ha definido previamente.

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención, al uso por separado, simultáneo o secuencial de los ingredientes activos (colagenasa G y colagenasa H) del kit de partes de la invención, o al uso de la forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con trastornos en el tejido conectivo, o de forma alternativa, a la composición de la invención, al kit de partes de la invención o a la forma farmacéutica de la invención, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con trastornos en el tejido conectivo.

En una realización preferente de la invención, la enfermedad que está relacionada con trastornos en el tejido conectivo es una fibromatosis. En un aspecto preferente de la invención, se selecciona fibromatosis de una lista de trastornos que incluyen: contractura palmar de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, enfermedad de Ledderhose o fibromatosis de la fascia plantar, o la existencia de tejido fibroso en el lóbulo de la oreja, o la fibrosis provocada por intervenciones quirúrgicas o accidentes que se llaman cicatrices retráctiles.

Las enfermedades relacionadas con alteraciones en el colágeno se identifican fácilmente mediante diagnóstico clínico y, si procede, por prueba histológica. Entonces, por ejemplo, la contractura de Dupuytren es diagnosticada por un médico durante una exploración física de la mano afectada.

Definiciones

Como se usa aquí, los términos "ingrediente activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "principio activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporciona una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad, o que afecta a la estructura y función del cuerpo humano y de otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del medicamento y que están presentes en el mismo en una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Tanto las composiciones de la presente invención, así como el kit de partes, se pueden formular para su administración a un animal y más preferentemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Por tanto, se pueden incluir, pero sin estar limitados a, soluciones acuosas estériles o en fluidos biológicos, tal como suero. Se pueden tamponar o no las soluciones acuosas y también pueden contener otros ingredientes activos o inactivos. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes, incluyendo, pero sin estar limitados a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. De forma alternativa, las composiciones se pueden preparar para su administración en forma sólida. Las composiciones se pueden combinar con otros varios vehículos o excipientes inertes diversos, incluyendo, pero sin estar limitados a: aglutinantes, tales como, celulosa microcristalina, tragacanto, gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido alginico de almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio; deslizantes, tales como dióxido de silicio coloidal; edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

El término "medicamento", como se usa en esta documentación hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de enfermedades en el hombre y animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es una enfermedad que cursa con alteraciones del tejido conectivo, preferentemente es una fibromatosis, y más preferentemente es una contractura palmar de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, enfermedad de Ledderhose o fibromatosis de la fascia plantar, o cicatrices retráctiles.

Dichas composiciones o preparaciones combinadas y/ o sus formulaciones se pueden administrar a un animal, incluyendo un mamífero, y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin estar limitadas a, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o tópica.

La dosis para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, tales como, por ejemplo, edad, sexo, tolerancia del mamífero. En el sentido usado en esta descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de colagenasa G y colagenasa H que produce el efecto deseado y, en general, se determina entre otros factores por las características intrínsecas del fármaco, derivados o análogos y por el efecto terapéutico que se va a obtener. Los "adyuvante" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que se podrían usar en dichas composiciones son vehículos bien conocidos en el campo.

Todas las enzimas (colagenasa G y colagenasa H) tienen una marca de 6 histidina que permite combinarlas en hidrogeles, tal como el ácido hialurónico. La marca de 6 histidina también permite purificar las enzimas usando cromatografía de afinidad por níquel. Además, la detección de la presencia de colagenasas en la sangre, en el torrente

5 circulatorio o en tejidos adyacentes se puede realizar usando inmunoensayos (por ejemplo, pero sin estar limitados a, ELISA). Para hacerlo, se usan anticuerpos específicos frente a colagenasas clostridiales, aunque éstas no distinguen entre colagenasa G y colagenasa H. Adicionalmente, las colagenasas en el medicamento tienen una marca 6-histidina, las enzimas también se pueden reconocer por ambos anticuerpos específicos frente a las colagenasas y frente a la marca 6-histidina.

En esta documentación, se entiende como trastornos del tejido conectivo enfermedades relacionadas con la acumulación subdérmica de este tipo de tejido.

10 El término fibromatosis se refiere a un grupo de tejidos que normalmente forman tumores benignos, se caracterizan por la ausencia de neoplasia maligna citológica y clínica. También se distingue por la proliferación de fibroblastos, una estructura de crecimiento del tipo infiltrativo y un comportamiento clínico agresivo con recurrencia frecuente. La fibromatosis incluye diversos subtipos: fibromatosis juvenil, fibromatosis colli, fibromatosis digital infantil, miofibromatosis infantil, ipofibromatosis, fibromatosis hialina juvenil, fibromatosis plantar, enfermedad de Peyronie y enfermedad de Dupuytren.

15 La enfermedad de Dupuytren (también denominada contractura de Dupuytren o contractura palmar de Dupuytren) consiste en una retracción de la palma con la situación donde determinados dedos no se pueden flexionar; normalmente comienza con un engrosamiento de la piel observado en la palma que podría evolucionar a un bulto duro de cordón grueso.

20 La enfermedad de Peyronie o induración plástica del pene es un proceso de causas desconocidas caracterizado por la presencia de una placa fibrosa errática en la túnica albugínea de los cuerpos cavernosos del pene. Normalmente es unilateral y tiene como consecuencia primordial una incurvación del pene durante la erección. Dependiendo de la extensión de esta placa fibrosa, el proceso podría impedir la penetración o hacer difícil la penetración, o producir dolor durante la erección.

25 La enfermedad de Ledderhose, también conocida como Morbus Ledderhose, fibromatosis plantar, y aponeurosis plantar, es una afección relativamente infrecuente; es un espesamiento no maligno del tejido conectivo profundo de los pies, o fascia. En el comienzo, los nódulos o cordones comienzan a crecer a lo largo de los tendones del pie; la enfermedad se considera leve, pero puede ser dolorosa. Eventualmente, sin embargo, las cuerdas se espesan, los dedos del pie se tornan rígidos y se flexionan, y caminar resulta doloroso. Como la mayoría de las fibromatosis, no es maligna y la evolución varía dependiendo de cada paciente. Los nódulos son típicamente de crecimiento lento y mayoritariamente se encuentran en porciones centrales o intermedias de la fascia plantar. Ocasionalmente los nódulos pueden estar inactivos durante meses o incluso años para comenzar repentinamente un crecimiento rápido y de manera inesperada. Si el dolor imposibilita caminar, la única solución es la cirugía.

30 La colagenasa G, uno de los ejemplos de la invención, posee una secuencia de 3357 nucleótidos (SEQ ID NO: 3) Los primeros 330 nucleótidos codifican para el péptido señal (SEQ ID NO: 4), el primer aminoácido de la forma secretada madura de la proteína está codificado por un codón ATA. La presencia del péptido señal y su procesamiento aseguran el plegamiento correcto de la forma natural activa final de la enzima. En el caso de la colagenasa G recombinante, después del último codón (codón de detención) se añade una secuencia que codifica para codones de 6-histidina. Esta marca 6-histidina es necesaria para fines de purificación y para inmovilizar la enzima en las formas farmacéuticas.

35 La secuencia de aminoácidos está compuesta por 1118 aminoácidos. Los 110 aminoácidos del extremo N terminal constituyen el péptido señal (SEQ ID NO: 5) y los 1008 aminoácidos restantes se corresponden con la colagenasa secretada (SEQ ID NO: 1).

La colagenasa G con péptido señal usada en la presente invención tiene los parámetros fisicoquímicos siguientes:

- Peso molecular: 127 kDa.
- Punto isoeléctrico: 5,8
- Número de cargas negativas (Asp + Glu): 160.
- 45 - Número de cargas positivas (Arg + Lys): 142.
- Índice teórico de inestabilidad: 26,61, que clasifica a la proteína como estable.
- Semivida teórica estimada en *Escherichia coli* (*in vivo*): más de 10 horas.

La colagenasa G sin péptido señal tiene los parámetros fisicoquímicos siguientes:

- Peso molecular: 114,8 kDa.
- 50 - Punto isoeléctrico: 5,53
- Número de cargas negativas (Asp + Glu): 145.

- Número de cargas positivas (Arg + Lys): 122.
- Índice teórico de inestabilidad: 24,11, que clasifica a la proteína como estable.
- Semivida teórica estimada en *Escherichia coli* (*in vivo*): más de 10 horas.

5 En la invención se pueden usar otras colagenasas similares a la colagenasa G. Por tanto, en el contexto de la presente invención, "colagenasa G" (ColG o AUX-I) también se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituyen la secuencia codificante de proteína "colagenasa G", y que también comprende diferentes variantes que proceden de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- 10 b) moléculas de ácido nucleico cuya hebra no codificante se hibrida con la secuencia de polinucleótidos de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) a causa de la redundancia del código genético, o
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % con SEQ ID NO: 1 en la que el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico tiene la actividad y características estructurales de la proteína "colagenasa G". El término también incluye proteínas que resultan de modificaciones postraduccionales.

15 La "colagenasa H" tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en 3066 nucleótidos (SEQ ID NO:6). Los primeros 120 (SEQ ID NO: 7) codifican un péptido señal y el primer aminoácido de la proteína madura secretada está codificado por un codón GTA. EL péptido señal se incorpora para permitir la secreción de la enzima en el medio extracelular. Una vez en la membrana bacteriana, el péptido señal se corta y la enzima activa se libera en el medio. En el caso de colagenasa H recombinante, el último codón (codón de detención) se elimina y se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifican para 6-histidinas necesarias para el procedimiento posterior de purificación o inmovilización en formas de dosificación.

20 La secuencia de aminoácidos consiste en 1021 aminoácidos. Los 40 residuos del extremo N que comprende el péptido señal (SEQ ID NO: 8) y los restantes 981 para la colagenasa secretada (SEQ ID NO: 2)

25 La colagenasa H con péptido señal tiene los parámetros fisicoquímicos siguientes:

- Peso molecular: 117,2 kDa
- Punto isoeléctrico: 5,99
- Número de cargas negativas (Asp + Glu): 142
- Número de cargas positivas (Arg + Lys): 128
- 30 - Índice de inestabilidad teórico: 35,48, que clasifica a la proteína como estable.
- Semivida teórica en *Escherichia coli* (*in vivo*): mayor de 10 horas.

La colagenasa H sin péptido señal tiene los parámetros fisicoquímicos siguientes:

- Peso molecular: 112,98 kDa
- Punto isoeléctrico: 5,76
- 35 - Número de cargas negativas (Asp + Glu): 141
- Número de cargas positivas (Arg + Lys): 122
- Índice de inestabilidad teórico: 35,30, que clasifica a la proteína como estable.
- Semivida teórica en *Escherichia coli* (*in vivo*): mayor de 10 horas.

40 En la invención también se pueden usar otras colagenasas similares a la colagenasa H. Por tanto, en el contexto de la presente invención, "colagenasa H" (ColH o AUX-II) también se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos, que constituyen la secuencia codificante de la proteína "colagenasa H", y que también comprende diferentes variantes que proceden de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,
- 45 b) moléculas de ácido nucleico cuya hebra no codificante se hibrida con la secuencia de polinucleótidos de a),

- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) a causa de la redundancia del código genético, o
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % con SEQ ID NO: 2. en la que el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico tiene la actividad y características estructurales de la proteína "colagenasa H". El término también incluye proteínas que resultan de modificaciones postraduccionales.

A lo largo de la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes a partir de la descripción y a partir de la práctica de la invención. Se proporcionan los ejemplos y dibujos siguientes a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Efecto sinérgico del uso de colagenasa G y colagenasa H en una relación de 1:3. Actividad de colagenasa G y colagenasa H por separado y en combinación en una relación de 1:3.

Figura 2. Diseño de la estructura molecular de colagenasa G y H. Las colagenasas tienen un dominio catalítico común y dominios de unión a colágeno (CBD). En el caso de ColG, este dominio se repite de forma que la afinidad por colágeno es mayor.

Figura 3. Comparación de la acción sinérgica de colagenasas. Se apreció un aumento del efecto sinérgico usando colagenasa G/H en proporciones preferentemente de 1:2-1:4 y 1:3 con un aumento del más del 25 % de la actividad específica.

Figura 4. Diseño de la inyección de la dosis de colagenasa en un gel ácido hialurónico en modelo de pata de pollo.

Figura 5. Variación en la longitud de los tendones después del tratamiento con colagenasa G/H 1:3 con y sin ácido hialurónico. Como se muestra en el gráfico, el efecto de AH-colagenasa se percibe a partir de las primeras 24 horas y hay un aumento gradual hasta lograr reducciones de más de 1,27 cm (0,5 pulgadas) después de 96 horas de tratamiento.

Figura 6. Variación en el diámetro de la sección transversal de los tendones después del tratamiento con colagenasa G/H 1:3 con y sin ácido hialurónico. Efecto diferencial de colagenasa G/H1:3 incluida en geles de ácido hialurónico y en solución acuosa. Como se muestra en el gráfico, hay un efecto significativo de reducción del diámetro de la sección del tendón después de 24 horas de tratamiento. El efecto del aumento del diámetro en controles a 24 y 48 horas es a causa del volumen de solución acuosa inyectada en el tendón, que por sí mismo aumenta el diámetro del tendón.

Ejemplos

Lo siguiente viene ilustrado por la invención por medio de pruebas llevadas a cabo por los inventores.

Ejemplo 1. Preparación y propiedades de colagenasas

Las colagenasa H y colagenasa G son metaloproteinasas (clase II) que pueden degradar específicamente las regiones helicoidales del colágeno, reconociendo el motivo Gly-Pro-X característico de la macromolécula. Estas proteínas tienen una cola de 6 histidinas en su extremo carboxilo (Demina & Lysenko. *Mikrobiologiya*. 1996 May-Jun; 65(3):293-304).

Punto isoeléctrico y peso molecular: Col.H: Ip 5,76; MW 112,98 kDa; Col.G: Ip 5,53; MW 114,8 kDa.

Pureza: 99,9 % de purificación por columnas de afinidad por níquel, intercambio catiónico y exclusión.

Se presenta como liofilizado y estéril. Se usó agua desionizada estéril para la reconstitución óptima.

Preparación madre

Para la preparación de colagenasa G/H 1:3, la presentación liofilizada contiene 800 CDU (0,3 mg aproximadamente). Para la administración se recomienda resuspender el contenido del vial en 1 ml de agua mQ estéril para obtener una solución de la enzima de 800 CDU/ml en tampón Tris 20 mM de pH 8,0. Se recomienda preparar esta solución en el momento de uso.

La dosificación recomendada depende del grado de avance de la enfermedad que oscila entre 100-800 CDU por aplicación.

Las colagenasas G y H recombinantes no tienen actividad de proteasa inespecíficas (caseinasa), prueba Ladd-Butler negativa. No contienen endotoxinas (prueba Gen Script negativa).

Ejemplo 2. Preparación de la forma farmacéutica de la invención

Colagenasa G (ColG o AUX-I) y colagenasa H (ColH o AUX-II) recombinantes (rColG y rColH), por separado o combinadas, y más específicamente en la relación 1:3 formuladas como gel terapéutico, tal como ácido hialurónico. El ácido hialurónico se clasifica como un dispositivo médico y se produjo por Novozymes Biopharma con un peso molecular de 850 kDa.

5 La densidad del ácido hialurónico debería ser suficiente como para permitir el tratamiento local y la liberación continua y controlada del ingrediente activo, las colagenasas. La densidad óptima del gel de ácido hialurónico de 850 kDa con colagenasa es del 1,5 %, lo que permite una consistencia adecuada para la inyección de fibras de colágeno, reteniendo de forma local el ingrediente activo y permitiendo la liberación controlada en el área de aplicación.

10 Cualquier otro gel de consistencia similar hecho con ácido hialurónico es equivalente usando pesos moleculares más altos o más bajos y concentraciones del mismo en soluciones acuosas variables entre el 0,05 %-4 %.

Las características del gel de ácido hialurónico deben permitir la liofilización para conservar el ingrediente activo con el tiempo. Además, el ácido hialurónico una vez liofilizado se puede reconstituir en agua para obtener una consistencia de gel similar a la del comienzo. La Tabla 1 muestra la estabilidad del gel para reconstruir su consistencia después de la liofilización.

15 Materiales

Dispositivo médico de ácido hialurónico ref. NZ HA - MMW 0,85 MDa

Dispositivo médico de ácido hialurónico ref. NZ HA - HMW 1,3 MDa

Tampón de PBS 4 mM de GIBCO™

Procedimiento analítico (equipo)

20 Viscómetro Brookfield (LV DV II + Pro)

Temperatura 25 °C

Geometría. Cono/placa CP 40

Análisis del peso molecular (SEC-MALS-RI)

Sistema: Sistema Waters Alliance HPLC y Wyatt MALS (Dawn EOS) y RI (Optilab rEX)

25 Programa informático: ASTRA 5

Columnas: Columna de guarda TSKgel PWXL (4 cm x 6,0 mm ID) y 2 x TSKgel G5000PWXL (30 cm x 7,8 mm ID).

Patrones: Ref AH, Dextran y BSA

30 La proporción de uso entre colagenasa G y colagenasa H se fija determinando la actividad específica entre las dos y en sinergia como se muestra en la Figura 3. La actividad de mezclas de ColG y ColH liofilizadas se hace manteniendo siempre la misma relación de ColG y variando la proporción de ColH, que es la proteína que incrementa la actividad de colagenasas total. En todos los tres ensayos mostrados, se observa que en dos de cada tres veces la mezcla óptima consiste en 1 molécula de ColG y 3 moléculas de ColH. La mezcla óptima de ColG/H incrementa la actividad final en más de 33 veces la actividad de ColG o en 3 veces la actividad de ColH por separado y en más del 25 % de la mezcla 1:1 de ColG:ColH (Figura 3).

35 Los resultados de la reconstitución del ácido hialurónico con agua destilada después de la liofilización del gel inicial indican que las muestras de ácido hialurónico con 3000 CDU de colagenasa G/H en relación 1:3 en concentraciones del 1,0, 1,5 y 2,0 % de ácido hialurónico de 850 kDa y del 1 % de ácido hialurónico de 1300 kDa en tampón de PBS tienen un comportamiento diferente como se muestra en la tabla siguiente (Tabla 1):

Muestra	Viscosidad (cP)	Peso molecular (kDa)
850-1,0 %	218	707
850-1,5 %	3203	707
850 - 2,0 %	5034	707
1300-1,0 %	1150	1339

40 Tabla 1. Viscosidad y peso molecular de formulaciones de ácido hialurónico de 850 kDa y 1300 kDa; cP (centipoise): medición de la viscosidad; MW (kDa): Medición del peso molecular extraída a partir del valor de la viscosidad.

Después de la liofilización, las mismas muestras se redisolieron a 25 °C en agua desionizada y se midieron tanto el peso molecular como la viscosidad dinámica (VD). Los resultados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2):

Muestra	Viscosidad	% de viscosidad retenida	Peso molecular (kDa)	% de peso molecular retenido	Tiempo de reconstitución
850-1,0 %	249	114,2	763	108	<10 min
850-1,5 %	2920	91,2	780	110	<15min
850 - 2,0 %	4542	90,2	757	107	<20 min
1300-1,0 %	1076	93,6	1275	95	< 90 min

Como se aprecia en la Tabla 2, tanto el peso molecular como la viscosidad retenida se han recuperado al completo después de la liofilización y redisolución.

- 5 La reconstitución de muestras seleccionadas de 850 kDa tiene que hacerse después de la liofilización, con agitación durante 10-20 minutos y las de 1300 kDa con agitación durante más de 90 minutos.

Se analizaron las muestras anteriores por el Departamento de Traumatología del Hospital Universitario de Albacete, que valoró la consistencia de los geles, el manejo de las agujas hipodérmicas (referencia: aguja hipodérmica de 13 mm de longitud y 0,3 mm de diámetro), la manipulación y la retención del tendón. Los resultados se muestran en la tabla siguiente (Tabla 3):

10

Muestra	Consistencia	Manejo de aguja	Manipulación	Retención del tendón	VALOR TOTAL
850-1,0 %	2	5	5	2	14
850-1,5 %	5	4	5	5	19
850-2,0 %	5	3	3	5	16
1300-1,0 %	5	2	3	5	15

Tabla 3. Evaluación de los hidrogeles. Clasificación: Mala 0-1, intermedia: 2-3, buena: 4-5

De acuerdo con los resultados previos, se eligió la concentración ideal del 1,5 % puesto que tiene la puntuación más alta de entre las muestras analizadas. Sin embargo, no se descarta el uso de otros materiales de partida y diferentes concentraciones, dependiendo de las necesidades observadas por el médico.

- 15 Los niveles de pureza deben cumplir con la regulación de las NCF (normas de correcta fabricación) para el uso de productos biológicos para uso humano.

Presentación del producto final

- 20 El fármaco se presenta en forma de polvo que tiene que reconstituirse en 0,450 ml en viales de borosilicato. Cada vial contiene entre 2000-8000 CDU de colagenasa, preferentemente 4000 CDU (1,1 mg aproximadamente) que contiene proteínas ColG y ColH y ácido hialurónico liofilizado y un tampón que contiene CaCl₂ 2 mM y NaCl 150 mM. El fármaco se reconstituye con agua desionizada estéril que proviene de un vial separado. El procedimiento de reconstitución de un gel de ácido hialurónico de 850 kDa al 1,5 % implica la incubación del gel liofilizado en agua desionizada estéril durante 15 minutos agitando a 25 °C.

- 25 El producto final es un gel que contiene el ingrediente activo necesario y suficiente para tratar anomalías vistas en algunas enfermedades, tales como la contractura de Dupuytren y otras anomalías similares.

- 30 Para el tratamiento de enfermedades relacionadas con deformaciones del colágeno atípicas, se usan preferentemente 4000 CDU, aunque las dosis pueden variar entre 2000-8000 CDU, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Los miligramos necesarios para formular las dosis de 4000 CDU están relacionados directamente con las unidades CDU/mg de cada lote, por tanto, siempre es necesario referir las dosis en unidades de enzima. Dado que la actividad media de las enzimas es de 3500 CDU/mg por lote, los miligramos requeridos para cada dosis serían de alrededor de 1,1 mg para una dosis de 4000 CDU (4000 CDU son los equivalentes de 13300 unidades ABC aproximadamente).

Los ensayos de eficacia realizados con colagenasa G/H en una relación de 1:3 en presencia de ácido hialurónico de 850 kDa al 1,5 % en tendones de pollo demuestran la efectividad del gel con respecto a la solución acuosa.

Ejemplo 3. Estudios *ex vivo* e *in vitro* de la actividad del gel sobre tendones de pollo

La actividad del gel se analizó sobre muestras de tendones de pollo Se llevaron a cabo pruebas *ex vivo* y pruebas sobre el efecto de la colagenasa con el tiempo.

5 Las pruebas *ex vivo* en la dosis que se va a usar se han realizado sobre 40 tendones de pollo en los cuales se analizaron más de 80 resultados. Con respecto a las pruebas sobre el efecto de la colagenasa sobre los tendones con el tiempo, se analizaron 24 tendones con un total de 7 medidas para cada tendón, por tanto, se analizaron 168 resultados.

10 Se inyectaron las patas de pollo de forma intratendinosa en tres partes diferentes en los lugares mostrados en la Figura 4; las dosis aplicadas fueron de 3000 CDU en un volumen total de 450 microlitros de gel de ácido hialurónico (una dosis se divide entre estas tres zonas de inyección). Las aplicaciones se hicieron en la parte posterior de la pata donde se sitúan los tendones principales.

Para determinar la eficacia del producto, se han realizado diferentes tipos de experimentaciones *in vitro*, tales como:

- Determinación de la dosis
- Estudios histológicos
- 15 - Estudios inmunohistoquímicos

Determinación de la dosis:

La óptima dosis de aplicación de gel de colagenasa sobre tendón se determinó aplicando diferentes dosis sobre la pata de pollo.

Se aplicó un gradiente en incremento de dosis de colagenasa G/H en una relación de 1:3 (Tabla 4):

Actividad de colagenasa (CDU)	Aplicación de estas unidades a:
300	- colagenasa + ácido hialurónico - colagenasa + tampón - tampón de control
1500	
3000	
6000	
12000	

20 Tabla 4. Dosis de colagenasa G/H en incremento en una relación de 1:3

Se llevó a cabo una sección longitudinal en cada pata para exponer el tendón y poner las tres inyecciones sobre el tejido. Entonces la pata se cosió para facilitar la acción de la colagenasa en gel sobre sobre el tejido.

La dosis de colagenasa G/H 1:3 se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

25 Paralelamente, la cantidad correspondiente de ácido hialurónico se resuspendió en 400 µl agua estéril para obtener una concentración del 1,5 %. Ambas soluciones se mezclaron, proporcionando una solución total de 450 µl. Por otra parte, la dosis de 50 µl de la enzima correspondiente se mezcló con agua, obteniendo de este modo el otro tampón en estudio.

Habrán dos tipos de controles negativos: uno donde una solución de ácido hialurónico al 1,5 % (450 µl) se inyecta y un control negativo donde se inyectan 450 µl de agua estéril.

30 Las muestras con dosis diferentes se mantuvieron inmóviles y se sumergieron en PBS 1x estéril a pH 7,2 a 37 °C durante 72 horas, después de lo cual se examinó la efectividad.

Después de este periodo, las patas se disecaron, se lavaron en PBS 1x a pH 7,2 los tendones extraídos. Se evaluó el tejido en estudios inmunohistoquímicos, que determinaron que la dosis óptima fue de 3000 CDU, como se muestra en la tabla siguiente (Tabla 5):

35

CDU	Efecto sobre el tendón	Efecto en tejidos adyacentes
300	0	0
1500	1	0
3000	2	0
6000	2	2
12000	3	3

Tabla 5: Clasificación histoquímica de las dosis aplicadas. Sin efecto evidente: 0; efecto ligero: 1; efecto significativo: 2; efecto desproporcionado: 3.

Después del análisis de los resultados inmunohistoquímicos sobre el tendón y los tejidos circundantes, se determinó que 3000 CDU era la dosis de uso óptima, que proporciona un efecto significativo sobre el tendón y sin efecto en los tejidos adyacentes.

Ejemplo 4. Determinación del efecto comparado entre colagenasa en solución acuosa y en gel de ácido hialurónico

Se usaron 3000 CDU de colagenasa como la aplicación óptima sobre el tendón de dosis de gel de colagenasa. El ensayo se realizó sobre tendones recién extraídos tomados de patas de pollo mediante cirugía. Todos los tendones se midieron al comienzo del experimento para tomar la referencia de control, puesto que al disecar los tendones la presencia de colagenasa no provoca que se rompan, sino que se observa el efecto de la hidrólisis en la reducción de tamaño.

Una vez medidos, los tendones se inyectaron con agujas hipodérmicas con cantidades similares de 450 µl de tampón de PBS, colagenasa G/H 1:3 en gel de ácido hialurónico de 850 kDa al 1,5 % y colagenasa G/H 1:3 en tampón de PBS.

Los ensayos se realizaron a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 180 h y 7 días. Después de cada uno de estos periodos, se midió la variación de los tendones en tamaños, obteniendo de este modo una reducción significativa en el caso de AH-colagenasa con respecto al control y a la colagenasa en solución, como se muestra en la tabla siguiente (Tabla 6):

	Control-PBS	Colagenasa-PBS	AH-colagenasa
T=0 h	0	0	0
T=24 h	0,0375	0,0875	-0,0625
T=48 h	0,0375	-0,1125	-0,1625
T=72 h	0,0375	-0,0125	-0,3625
T=96 h	0,0375	-0,0625	-0,5125
T= 120 h	0,0875	-0,0125	-0,4125
T= 7 días	0,0458	-0,05	-0,5125

Tabla 6. Reducción de tamaño del tendón (en centímetros (cm)). Las diferencias con respecto al control y colagenasa en solución acuosa son significativas, primordialmente a causa del efecto de dilución después de la inyección. Este efecto de dilución no se observa en el caso del gel, puesto que es un producto con una estructura sólida y cuya acción está concentrada de forma local sobre el tendón.

También, el efecto observado en el engrosamiento del tendón después del mismo tratamiento previo muestra una reducción del diámetro de sección transversal del tendón, lo que es significativo en el caso de las colagenasas incluidas en el gel de ácido hialurónico, como se muestra en la tabla a continuación (Tabla 7):

ES 2 529 349 T3

	AH-colagenasa	Control	colagenasa-tampón
T=0 h	0	0	0
T=24 h	-0,025	0,125	0,175
T=48 h	-0,025	0,025	0,125
T=72 h	-0,125	-0,025	-0,025
T=96 h	-0,075	0,075	-0,025
T= 120 h	-0,125	-0,025	-0,025
T= 7 días	-0,125	0,025	0,0125

Tabla 7. Variación en centímetros en el diámetro de la sección de los tendones después del tratamiento con colagenasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Zurko Research

<120> Uso de colagenasa G recombinante, colagenasa H recombinante y pz-peptidasa recombinante para el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones del colageno.

5 <130> Zurko 2281

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1008

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Colagenasa G

<400> 1

Ile Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly
1 5 10 15

Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn
20 25 30

Gln Ile Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe
35 40 45

Gly Asp Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser
50 55 60

Gly Arg Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr
65 70 75 80

Glu Val Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu
85 90 95

Ser Tyr Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met
100 105 110

Ile Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln
115 120 125

Asp Glu Val Ile Thr Ser Leu Gly Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ser Ala
130 135 140

Asn Ala Glu Val Val Asn Asn Cys Val Pro Val Leu Lys Gln Phe Arg
145 150 155 160

Glu Asn Leu Asn Gln Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Lys Gly Thr Ala Val
165 170 175

15

ES 2 529 349 T3

Asn Glu Leu Ile Lys Gly Ile Glu Phe Asp Phe Ser Gly Ala Ala Tyr
 180 185 190
 Glu Lys Asp Val Lys Thr Met Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Pro Phe
 195 200 205
 Ile Asn Glu Leu Lys Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Ile Thr Ser Ala
 210 215 220
 Thr Glu Trp Ala Ser Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Leu Ser Lys Phe Gly
 225 230 235 240
 Leu Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Asp Ile Val Gln Ser Leu Glu Lys Ala
 245 250 255
 Val Asp Met Tyr Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Phe Val Ala Met Glu Arg
 260 265 270
 Ile Thr Trp Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Asn Gly Lys Lys Val Asp
 275 280 285
 His Asp Lys Phe Leu Asp Asp Ala Glu Lys His Tyr Leu Pro Lys Thr
 290 295 300
 Tyr Thr Phe Asp Asn Gly Thr Phe Ile Ile Arg Ala Gly Asp Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Glu Glu Lys Ile Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Val Lys
 325 330 335
 Ser Gln Phe His Arg Val Val Gly Asn Asp Lys Ala Leu Glu Val Gly
 340 345 350
 Asn Ala Asp Asp Val Leu Thr Met Lys Ile Phe Asn Ser Pro Glu Glu
 355 360 365
 Tyr Lys Phe Asn Thr Asn Ile Asn Gly Val Ser Thr Asp Asn Gly Gly
 370 375 380
 Leu Tyr Ile Glu Pro Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Tyr Glu Arg Thr Pro
 385 390 395 400
 Gln Gln Ser Ile Phe Ser Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr
 405 410 415
 His Tyr Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly
 420 425 430
 Pro Phe Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala
 435 440 445

ES 2 529 349 T3

Glu Phe Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys
 450 455 460
 Ser Ile Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser
 465 470 475 480
 Leu Lys Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe
 485 490 495
 Tyr Asn Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met
 500 505 510
 Pro Thr Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys
 515 520 525
 Ser Tyr Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn
 530 535 540
 Thr Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Ala Asp Lys Tyr Gln Gly
 545 550 555 560
 Ala Gly Ile Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr
 565 570 575
 Lys Lys Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu
 580 585 590
 Thr Asn Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe
 595 600 605
 Thr Leu Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys
 610 615 620
 Asp Trp Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu
 625 630 635 640
 Ala Lys Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr
 645 650 655
 Asn Tyr Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe
 660 665 670
 His Gly Val Leu Thr Asp Asn Ala Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro
 675 680 685
 Ile Ala Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile
 690 695 700
 Glu Phe Ser Gly Lys Asp Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser
 705 710 715 720

ES 2 529 349 T3

Tyr Asp Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ala Thr Ser Arg Gly Lys Asn Ser
 725 730 735
 Val His Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Thr Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val
 740 745 750
 Thr Asp Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr Ile Glu Ile
 755 760 765
 Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn
 770 775 780
 Asp Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val
 785 790 795 800
 Lys Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp
 805 810 815
 Val Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser
 820 825 830
 Ser Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His
 835 840 845
 Ile Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys
 850 855 860
 Ser Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala
 865 870 875 880
 Ser Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys
 885 890 895
 Leu Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile
 900 905 910
 Pro Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser
 915 920 925
 Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile
 930 935 940
 Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro
 945 950 955 960
 Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn
 965 970 975
 Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu
 980 985 990

Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Asn Lys
 995 1000 1005

<210> 2

<211> 981

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Colagenasa H

<400> 2

Val Gln Asn Glu Ser Lys Arg Tyr Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu
 1 5 10 15
 Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn
 20 25 30
 Leu Pro Asp Leu Phe Gln Tyr Ser Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly
 35 40 45
 Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala
 50 55 60
 Pro Gln Tyr Thr Glu Ile Asp His Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu
 65 70 75 80
 Val Val Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Phe His Asn Lys Glu Leu Asn
 85 90 95
 Glu Ile Asn Lys Arg Ser Phe Lys Glu Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu
 100 105 110
 Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Glu Val Gln Asp
 115 120 125
 Lys Ile Val Ser Ala Thr Gly Leu Leu Ala Gly Asn Glu Thr Ala Pro
 130 135 140
 Pro Glu Val Val Asn Asn Phe Thr Pro Ile Leu Gln Asp Cys Ile Lys
 145 150 155 160
 Asn Ile Asp Arg Tyr Ala Leu Asp Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe
 165 170 175
 Asn Val Leu Ala Ala Pro Thr Tyr Asp Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Ala
 180 185 190
 Thr Lys Glu Lys Pro Glu Asn Thr Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Gly
 195 200 205
 Phe Ile Asn Glu Leu Lys Lys Leu Ala Leu Tyr Gly Lys Ile Asn Asp
 210 215 220

ES 2 529 349 T3

Asn 225 Asn Ser Trp Ile Ile 230 Asp Asn Gly Ile Tyr 235 His Ile Ala Pro Leu 240
 Gly Lys Leu His Ser 245 Asn Asn Lys Ile Gly 250 Ile Glu Thr Leu Thr Glu 255
 Val Met Lys Val 260 Tyr Pro Tyr Leu Ser 265 Met Gln His Leu Gln Ser Ala 270
 Asp Gln Ile 275 Lys Arg His Tyr Asp 280 Ser Lys Asp Ala Glu 285 Gly Asn Lys
 Ile Pro 290 Leu Asp Lys Phe Lys 295 Lys Glu Gly Lys Glu 300 Lys Tyr Cys Pro
 Lys 305 Thr Tyr Thr Phe Asp 310 Asp Gly Lys Val Ile 315 Ile Lys Ala Gly Ala 320
 Arg Val Glu Glu Glu 325 Lys Val Lys Arg Leu 330 Tyr Trp Ala Ser Lys Glu 335
 Val Asn Ser Gln 340 Phe Phe Arg Val Tyr 345 Gly Ile Asp Lys Pro 350 Leu Glu
 Glu Gly Asn 355 Pro Asp Asp Ile Leu 360 Thr Met Val Ile Tyr 365 Asn Ser Pro
 Glu Glu 370 Tyr Lys Leu Asn Ser 375 Val Leu Tyr Gly Tyr 380 Asp Thr Asn Asn
 Gly Gly Met Tyr Ile Glu 390 Pro Glu Gly Thr Phe 395 Phe Thr Tyr Glu Arg 400
 Glu Ala Gln Glu Ser 405 Thr Tyr Thr Leu Glu 410 Glu Leu Phe Arg His Glu 415
 Tyr Thr His Tyr 420 Leu Gln Gly Arg Tyr 425 Ala Val Pro Gly Gln Trp Gly 430
 Arg Thr Lys 435 Leu Tyr Asp Asn Asp 440 Arg Leu Thr Trp Tyr 445 Glu Glu Gly
 Gly Ala Glu Leu Phe Ala Gly 455 Ser Thr Arg Thr Ser 460 Gly Ile Leu Pro
 Arg Lys Ser Ile Val Ser 470 Asn Ile His Asn Thr 475 Thr Arg Asn Asn Arg 480
 Tyr Lys Leu Ser Asp 485 Thr Val His Ser Lys 490 Tyr Gly Ala Ser Phe Glu 495

Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys Met Phe Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp
 500 505 510
 Met Gly Ile Leu Asn Lys Leu Asn Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val
 515 520 525
 Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu
 530 535 540
 Asn Asp Lys Tyr Gln Asp His Met Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu
 545 550 555 560
 Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala
 565 570 575
 Tyr Lys Asn Pro Asn Glu Ile Tyr Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys
 580 585 590
 Leu Lys Asp Ala Lys Ser Glu Val Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr
 595 600 605
 Phe Thr Leu Arg Gly Ser Tyr Thr Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu
 610 615 620
 Glu Asp Gln Lys Ala Met Asn Lys Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys
 625 630 635 640
 Leu Asp Thr Tyr Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe
 645 650 655
 Thr Asn Tyr Lys Val Asp Ser Ser Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val
 660 665 670
 Phe His Gly Tyr Leu Pro Asn Glu Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro
 675 680 685
 Tyr Gly Lys Ile Asn Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile
 690 695 700
 Lys Phe Ser Ser Glu Gly Ser Phe Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser
 705 710 715 720
 Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro
 725 730 735
 Glu His Ser Tyr Asp Lys Val Gly Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val
 740 745 750
 Thr Asp Asp Lys Gly Glu Ser Ser Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile
 755 760 765

Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro
 770 775 780

Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr
 785 790 795 800

Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp
 805 810 815

Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys
 820 825 830

Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln
 835 840 845

Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro
 850 855 860

Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly
 865 870 875 880

Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser
 885 890 895

Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys
 900 905 910

Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr
 915 920 925

Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn
 930 935 940

Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His
 945 950 955 960

Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu
 965 970 975

Gly Ser Val Gly Arg
 980

<210> 3

<211> 3357

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Colagenasa G y péptido señal

<400> 3

atgaaaaaaa atattttaa gattcttatg gatagttatt ctaaagaatc taaaattcaa

60

actgtacgta	gggttacgag	tgtatcactt	ttagcgggat	atcttactat	gaatacttca	120
agtttagttt	tagcaaaacc	aatagaaaat	actaatgata	ctagtataaa	aaatgtggag	180
aaattaagaa	atgctccaaa	tgaagagaat	agtaaaaagg	tagaagatag	taaaaatgat	240
aaggtagaac	atgtgaaaaa	tatagaagag	gcaaagggtg	agcaagttgc	acccgaagta	300
aaatctaaat	caactttaag	aagtgcctct	atagcgaata	ctaattctga	gaaatatgat	360
tttgagtatt	taaatgggtt	gagctatact	gaacttaca	atttaattaa	aaatataaag	420
tggaatcaaa	ttaatgggtt	atttaattat	agtacagggt	ctcaaaagt	ctttggagat	480
aaaaatcgtg	tacaagctat	aattaatgct	ttacaagaaa	gtggaagaac	ttacactgca	540
aatgatatga	agggtataga	aactttcact	gaggttttaa	gagctgggtt	ttatttaggg	600
tactataatg	atggtttatc	ttatttaaat	gatagaaact	tccaagataa	atgtatacct	660
gcaatgattg	caattcaaaa	aaatcctaac	ttaagctag	gaactgcagt	tcaagatgaa	720
gttataactt	ctttaggaaa	actaatagga	aatgcttctg	ctaattgctga	agtagttaat	780
aattgtgtac	cagttctaaa	acaatttaga	gaaaacttaa	atcaatatgc	tcctgattac	840
gttaaaggaa	cagctgtaaa	tgaattaatt	aaaggatttg	aattcgattt	ttctggtgct	900
gcatatgaaa	aagatgttaa	gacaatgcct	tggtatggaa	aaattgatcc	atttataaat	960
gaacttaagg	ccttaggtct	atatggaaat	ataacaagtg	caactgagtg	ggcatctgat	1020
gttggaatat	actatttaag	taaattcggg	ctttactcaa	ctaaccgaaa	tgacatagta	1080
cagtcacttg	aaaaggctgt	agatatgtat	aagtatggta	aaatagcctt	tgtagcaatg	1140
gagagaataa	cttgggatta	tgatgggatt	ggttctaattg	gtaaaaagg	ggatcacgat	1200
aagttcttag	atgatgctga	aaaacattat	ctgccaaaga	catatacttt	tgataatgga	1260
acctttatta	taagagcagg	ggataaggta	tccgaagaaa	aaataaaaag	gctatattgg	1320
gcatcaagag	aagtgaagtc	tcaattccat	agagtagttg	gcaatgataa	agctttagag	1380
gtgggaaatg	ccgatgatgt	tttaactatg	aaaatattta	atagcccaga	agaatataaa	1440
tttaatacca	atataaatgg	tgtaagcact	gataatgggtg	gtctatatat	agaaccaaga	1500
gggactttct	acacttatga	gagaacacct	caacaagta	tatttagtct	tgaagaattg	1560
tttagacatg	aatatactca	ctatttaca	gcgagatatc	ttgtagatgg	tttatggggg	1620
caaggtccat	tttatgaaaa	aaatagatta	acttggtttg	atgaaggtag	agctgaattc	1680
tttgcaggat	ctaccctgac	atctggtggt	ttaccaagaa	aatcaatatt	aggatatttg	1740
gctaaggata	aagtagatca	tagatactca	ttaaagaaga	ctcttaattc	agggtatgat	1800
gacagtgatt	ggatgttcta	taattatgga	tttgcagttg	cacattacct	atatgaaaaa	1860
gatatgccta	cattttattaa	gatgaataaa	gctatattga	atacagatgt	gaaatcttat	1920
gatgaataaa	taaaaaaatt	aagtgatgat	gcaaataaaa	atacagaata	tcaaaacct	1980
attcaagagt	tagcagataa	atatcaagga	gcaggcatac	ctctagtatc	agatgattac	2040
ttaaagatc	atggatataa	gaaagcatct	gaagtatatt	ctgaaatttc	aaaagctgct	2100

tctcttacia acactagtgt aacagcagaa aaatctcaat attttaacac attcacttta 2160
 agaggaactt atacaggtga aacttctaaa ggtgaattta aagattggga tgaatgagt 2220
 aaaaaattag atggaacttt ggagtccttt gctaaaaatt cttggagtgg atacaaaact 2280
 ttaacagcat actttacgaa ttatagagtt acaagcgata ataaagttca atatgatgta 2340
 gttttccatg gggttttaac agataatgcg gatattagta acaataaggc tccaatagca 2400
 aaggtaactg gaccaagcac tgggtgctgta ggaagaaata ttgaatttag tggaaaagat 2460
 agtaaagatg aagatggtaa aatagatca tatgattggg attttggcga tgggtgcaact 2520
 agtagaggca aaaattcagt acatgcttac aaaaaagcag gaacataata tgttacatta 2580
 aaagtaactg acgataaggg tgcaacagct acagaaagct ttactataga aataaagaac 2640
 gaagatacaa caacacctat aactaaagaa atggaaccta atgatgatat aaaagaggct 2700
 aatgggtcaa tagttgaagg tgttactgta aaagggtgatt taaatggttc tgatgatgct 2760
 gataccttct attttgatgt aaaagaagat ggtgatgta caattgaact tccttattca 2820
 gggatcatcta atttcacatg gttagtattat aaagagggag acgatcaaaa ccatattgca 2880
 agtggatatag ataagaataa ctcaaaagtt ggaacattta aatctacaaa aggaagacat 2940
 tatgtgttta tatataaaca cgattctgct tcaaatatat cctattcttt aaacataaaa 3000
 ggattaggta acgagaaatt gaaggaaaa gaaaataatg attcttctga taaagctaca 3060
 gttataccaa atttcaatac cactatgcaa ggttcacttt taggtgatga ttcaagagat 3120
 tattattctt ttgaggttaa ggaagaaggc gaagttaata tagaactaga taaaaaggat 3180
 gaatttggtg taacatggac actacatcca gagtcaaata ttaatgacag aataacttac 3240
 ggacaagttg atggtaataa ggtatcta ataaagttaat taagaccagg aaaatattat 3300
 ctacttgttt ataaatactc aggatcagga aactatgagt taagggtaaa taaataa 3357

<210> 4

<211> 330

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido señal colagenasa G

<400> 4
 atgaaaaaaaa atattttaa gattcttatg gatagttatt ctaaagaatc taaaattcaa 60
 actgtacgta gggttacgag tgtatcactt ttagcggat atcttactat gaatacttca 120
 agtttagttt tagcaaaacc aatagaaaat actaatgata ctagtataaa aaatgtggag 180
 aaattaagaa atgctccaaa tgaagagaat agtaaaaagg tagaagatag taaaaatgat 240
 aaggtagaac atgtgaaaa tatagaagag gcaaagggtg agcaagttgc acccgaagta 300
 aaatctaaat caactttaag aagtgcctct 330

<210> 5

<211> 110

ES 2 529 349 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido señal colagenasa G
 <400> 5

5

Met Lys Lys Asn Ile Leu Lys Ile Leu Met Asp Ser Tyr Ser Lys Glu
 1 5 10 15
 Ser Lys Ile Gln Thr Val Arg Arg Val Thr Ser Val Ser Leu Leu Ala
 20 25 30
 Val Tyr Leu Thr Met Asn Thr Ser Ser Leu Val Leu Ala Lys Pro Ile
 35 40 45
 Glu Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile Lys Asn Val Glu Lys Leu Arg Asn
 50 55 60
 Ala Pro Asn Glu Glu Asn Ser Lys Lys Val Glu Asp Ser Lys Asn Asp
 65 70 75 80
 Lys Val Glu His Val Lys Asn Ile Glu Glu Ala Lys Val Glu Gln Val
 85 90 95
 Ala Pro Glu Val Lys Ser Lys Ser Thr Leu Arg Ser Ala Ser
 100 105 110

<210> 6
 <211> 3066
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> colagenasa H y péptido señal
 <400> 6

10

atgaaaagga aatgtttatc taaaaggctt atggttagcta taacaatggc tacaatattt 60
 acagtgaaca gtacattacc aatttatgca gctgtagata aaaataatgc aacagcagct 120
 gtacaaaatg aaagtaagag gtatacagta tcatatttaa agactttaa ttattatgac 180
 ttagtagatt tgcttgtaa gactgaaatt gagaatttac cagacctttt tcagtatagt 240
 tcagatgcaa aagagttcta tggaaataaa actcgtatga gctttatcat ggatgaaatt 300
 ggtagaaggg cacctcagta tacagagata gatcataaag gtattcctac tttagtagaa 360
 gttgtaagag ctggatttta ctaggattc cataacaagg aattgaaatga aataaacaag 420
 aggtctttta aagaaaggg aataccttct atattagcaa ttcaaaaaa tcctaatttt 480
 aaactaggta ctgaagttca agataaaata gtatctgcaa caggactttt agctggtaat 540
 gaaacagcgc ctccagaagt tgtaaataat tttacaccaa tacttcaaga ctgtataaag 600
 aatatagaca gatacgctct tgatgattta aagtcaaaag cattatttaa tgttttagct 660
 gcacctacct atgatataac tgagtattta agagctacta aagaaaacc agaaaacact 720

ccttggtatg	gtaaaataga	tgggtttata	aatgaactta	aaaagttagc	tctttatgga	780
aaaataaatg	ataataactc	ttggataata	gataacggta	tatatcatat	agcaccttta	840
gggaagttac	atagcaataa	taaaatagga	atagaaactt	taacagaggt	tatgaaagtt	900
tatccttatt	taagtatgca	acatttacia	tcagcagatc	aaattaagcg	tcattatgat	960
tcaaaagatg	ctgaaggaaa	caaaatacct	ttagataagt	ttaaaaagga	aggaaaagaa	1020
aaatactgtc	caaaaactta	tacatttgat	gatggaaaag	taataataaa	agctggtgct	1080
agagtagaag	aagaaaaagt	taaaagacta	tactgggcat	caaaggaagt	taactctcaa	1140
ttcttttagag	tatacggaat	agacaaacca	ttagaagaag	gtaatccaga	tgatatatta	1200
acaatggtta	tctacaacag	tcccgaagaa	tataaactca	atagtgttct	atacggatat	1260
gatactaata	atggtggtat	gtatatagag	ccagaaggaa	ctttcttcac	ctatgaaaga	1320
gaagctcaag	aaagcacata	cacattagaa	gaattattta	gacatgaata	tacacattat	1380
ttgcaaggaa	gatatgcagt	tccaggacaa	tggggaagaa	caaaaacttta	tgacaatgat	1440
agattaactt	ggtatgaaga	aggtggagca	gaattatttg	caggttctac	tagaacttct	1500
ggaatattac	caagaaagag	tatagtatca	aatattcata	atacaacaag	aaataataga	1560
tataagcttt	cagacactgt	acattctaaa	tatggtgcta	gttttgaatt	ctataattat	1620
gcatgtatgt	ttatggatta	tatgtataat	aaagatatgg	gtatattaaa	taaactaaat	1680
gatcttgcaa	aaaataatga	tgttgatgga	tatgataatt	atattagaga	tttaagttct	1740
aattatgctt	taaatgataa	atatcaagat	catatgcagg	agcgcataga	taattatgaa	1800
aatttaacag	tgccttttgt	agctgatgat	tatttagtaa	ggcatgctta	taagaaccct	1860
aatgaaatth	attctgaaat	atctgaagta	gcaaaattaa	aggatgctaa	gagtgaagtt	1920
aagaaatcac	aatattttag	tacctttact	ttgagaggta	gttacacagg	tggagcatct	1980
aaggggaaat	tagaagatca	aaaagcaatg	aataagttta	tagatgattc	acttaagaaa	2040
ttagatacgt	attcttggag	tgggtataaa	actttaactg	cttatttcac	taattataaa	2100
gttgactctt	caaatagagt	tacttatgat	gtagtattcc	acggatattt	accaaacgaa	2160
ggtgattcca	aaaattcatt	accttatggc	aagatcaatg	gaacttacia	gggaacagag	2220
aaagaaaaaa	tcaaattctc	tagtgaaggc	tctttcgatc	cagatggtaa	aatagtttct	2280
tatgaatggg	atttcggaga	tggtaataag	agtaatgagg	aaaatccaga	gcattcatat	2340
gacaaggtag	gaacttatac	agtgaaatta	aaagttactg	atgacaaggg	agaatcttca	2400
gtatctaacta	ctactgcaga	aataaaggat	ctttcagaaa	ataaacttcc	agttatatat	2460
atgcatgtac	ctaaatccgg	agccttaaat	caaaaagttg	ttttctatgg	aaaaggaaca	2520
tatgaccag	atggatctat	cgcaggatat	caatgggact	ttggtgatgg	aagtgatttt	2580
agcagtgaac	aaaaccaag	ccatgtatat	actaaaaaag	gtgaatatac	tgtaacatta	2640
agagtaatgg	atagtagtgg	acaaatgagt	gaaaaaacta	tgaagattaa	gattacagat	2700
ccggtatatc	caataggcac	tgaaaaagaa	ccaataaca	gtaaagaaac	tgcaagtgg	2760

ccaatagtac caggatatacc tgtttagtgga accatagaaa atacaagtga tcaagattat 2820
ttctatatttg atgttataac accaggagaa gtaaaaatag atataaataa attagggtac 2880
ggaggagcta cttgggtagt atatgatgaa aataataatg cagtatctta tgccactgat 2940
gatgggcaaa atttaagtgg aaagtttaag gcagataaac caggtagata ttacatccat 3000
ctttacatgt ttaatggtag ttatatgcca tatagaatta atatagaagg ttcagtagga 3060
agataa 3066

<210> 7

<211> 120

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido señal

<400> 7
atgaaaagga aatgtttatc taaaaggctt atgttagcta taacaatggc tacaatattt 60
acagtgaaca gtacattacc aatttatgca gctgtagata aaaataatgc aacagcagct 120

<210> 8

10 <211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido señal

15 <400> 8

Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met
1 5 10 15
Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val
20 25 30
Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala
35 40

REIVINDICACIONES

1. Un producto seleccionado del grupo que consiste en una composición y un kit de partes, en el que el producto comprende colagenasa G recombinante y colagenasa H recombinante con una relación de masa de entre 1:2,5 y 1:3,5.
- 5 2. El producto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación de masa de colagenasa G recombinante con respecto a colagenasa H recombinante es de aproximadamente 1:3.
3. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la colagenasa G recombinante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con un marca 6-histidina situada en el extremo C.
- 10 4. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la colagenasa H recombinante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 con un marca 6-histidina situada en el extremo C.
5. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el producto es una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que adicionalmente comprende otro ingrediente activo.
- 15 7. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende una o más composiciones en la forma de: emplastos, pomada, pasta, crema, solución, suspensión, emulsión, loción, linimento, gelatina, gel, espuma, polvo, o cualquier combinación de los mismos.
8. El producto de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las una o más composiciones están en la forma de un gel.
- 20 9. El producto como se define en la reivindicación 8, que comprende ácido hialurónico en concentraciones de entre el 0,05 % y 4 %.
10. El producto de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las concentraciones de colagenasas son más altas de 400 CDU/mg de ácido hialurónico.
- 25 11. El producto de acuerdo con la reivindicación 10, en el que las concentraciones de colagenasas oscilan entre 450 y 5000 CDU/mg de ácido hialurónico.
12. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular entre 500 y 5000 kDa.
13. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso como un medicamento.
- 30 14. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso como un medicamento, en el que el producto es un kit de partes y en el que la colagenasa G recombinante se administra antes de la colagenasa H recombinante.
15. El producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones en el tejido conectivo.
16. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la enfermedad es fibromatosis.
- 35 17. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la fibromatosis está seleccionada de la lista que incluye: contractura de Dupuytren palmar, la enfermedad de La Peyronie, enfermedad de Ledderhose o fibromatosis de la fascia plantar o cicatrices retráctiles.

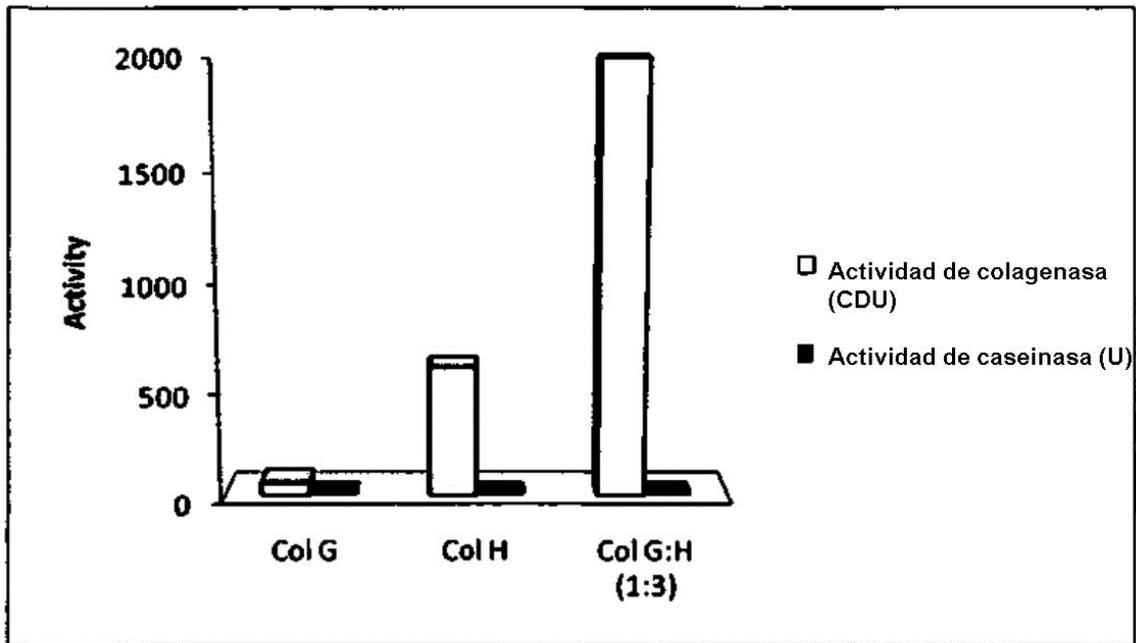


FIG. 1

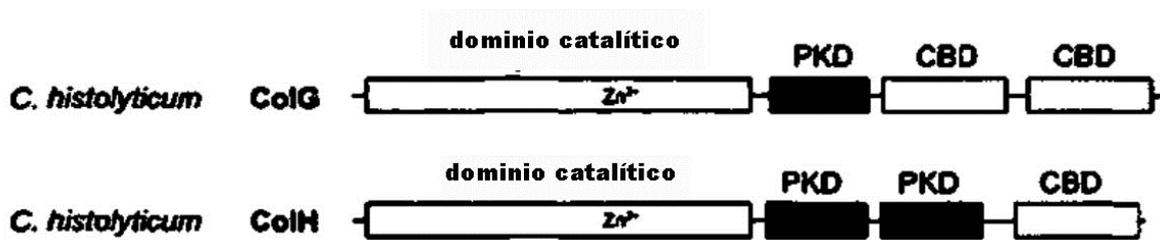


FIG. 2

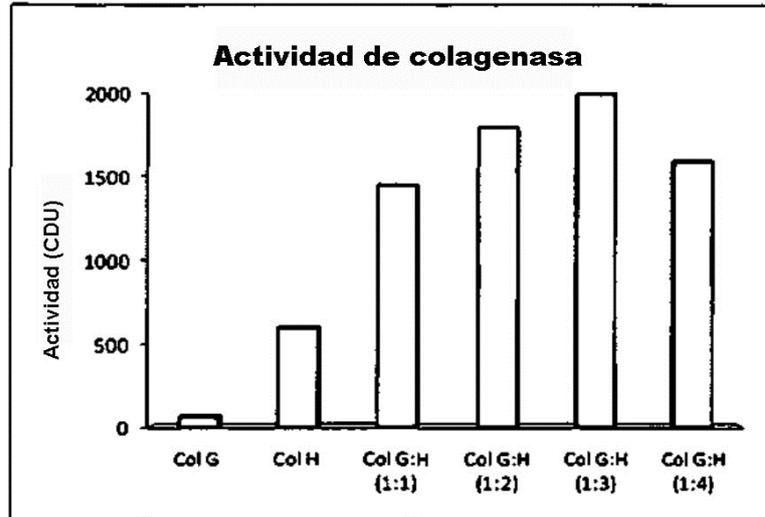
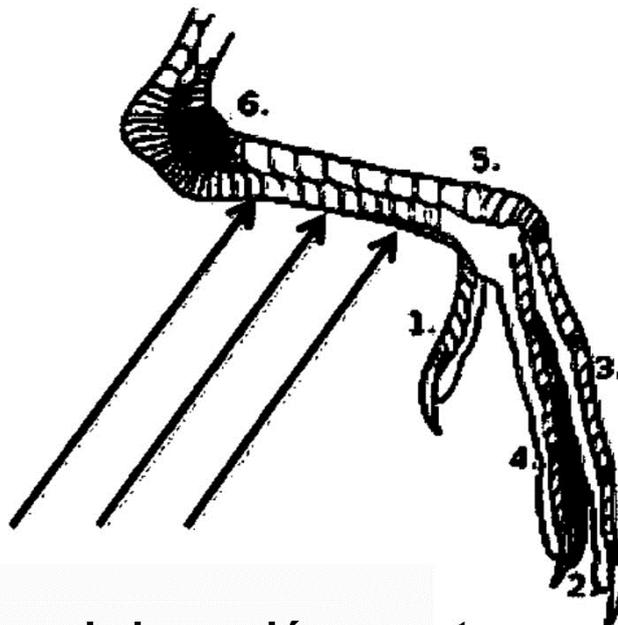


FIG. 3



Zonas de inyección en patas de pollo enteras

FIG. 4

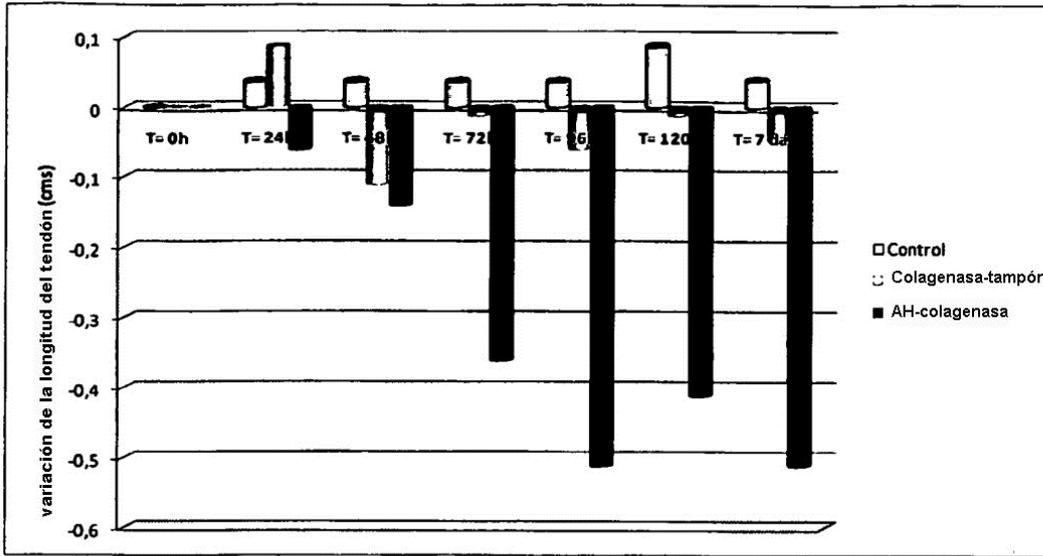


FIG. 5

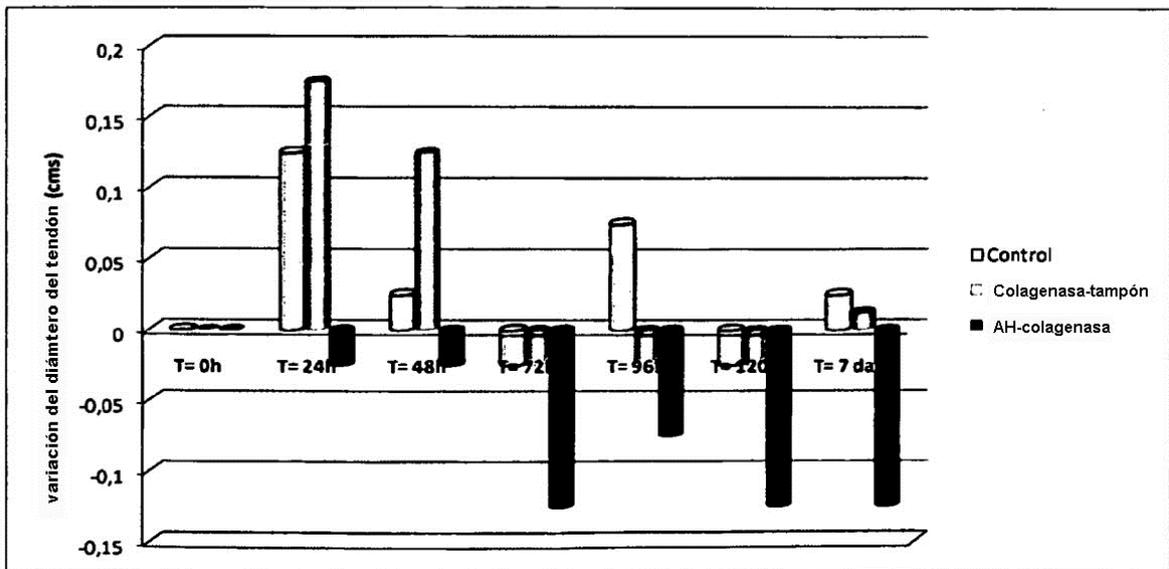


FIG. 6